

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN VON
LISTERIA MONOCYTOGENES IN ROHMILCH
IN SÜDWÜRTTEMBERG**

EMIL GASPAROVIC

1988

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554816_0081

Aus dem Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt
Aulendorf
Vorstand: Ltd.Reg.Vet.Direktor Dr.B.Müller

vorgelegt über das

Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof.Dr.G.Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Untersuchungen über das Vorkommen von
Listeria monocytogenes in Rohmilch
in Südwürttemberg

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Emil G a s p a r o v i c

aus

Zagreb / Jugoslawien

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. Dr. F. Bakels

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	3
2.1.	Taxonomische Einteilung von Listerien	3
2.2.	Eigenschaften von Listerien	4
2.2.1	Morphologische und biochemische Eigenschaften	4
2.2.2	Tenazität	10
2.3	Nachweis von Listerien	14
2.3.1	Allgemeines zur Isolierung	14
2.3.2	Isolierung aus der Milch	17
2.3.3	Identifizierung	18
2.4	Zum Vorkommen von Listerien	21
2.4.1	Beim Tier	21
2.4.2	In Milch	23
2.4.3	Beim Menschen	31
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	33
3.1	Material	33
3.1.1	Probenentnahme	36
3.2.	Medien und Reagenzien	38

	Seite
3.3 Methodik des Listeriennachweises	40
3.3.1 Selektive Anreicherung	41
3.3.2 Bestätigung der verdächtigen Isolate	42
3.4 Ergebnisse	45
4. DISKUSSION	49
5. ZUSAMMENFASSUNG	56
6. SUMMARY	57
7. LITERATURVERZEICHNIS	58

1. EINLEITUNG

Listeria monocytogenes (L.m.) ist ein in der Natur ubiquitär vorkommendes und weit verbreitetes Bakterium, das im Wirtsorganismus (viele Tierarten und Mensch) die Listeriose-Erkrankung hervorrufen kann.

In der Epidemiologie dieser auch als Sapronose bezeichneten Krankheit (MAUPAS et al., 1975; ORTEL, 1975) stehen Lebensmittel tierischer Herkunft als mögliche Infektionsquelle für Menschen im Vordergrund. Während bei früheren Listerioseerkrankungen ein direkter Zusammenhang zwischen dem Konsum von bestimmten Lebensmitteln und dem Auftreten der Krankheit nicht erkennbar war, wurden bei Gruppenerkrankungen in Nordamerika in den letzten Jahren Krautsalat (SCHLECH et al., 1983), Konsummilch (FLEMING et al., 1985) und Labkäse nach mexikanischer Art (JAMES et al., 1985), sowie in der Schweiz bei gehäuften Erkrankungen ein Rotschmierweichkäse - Vacherin Mont d'Or (BILLE, 1988) als Infektionsquelle ermittelt.

In der internationalen Fachliteratur berichteten verschiedene Autoren über das Vorkommen von L.m. in der Milch einzelner Tiere, die entweder an Listeriose bzw. einer Mastitis erkrankt oder klinisch gesunde Keimausscheider waren. Es gibt aber bisher relativ wenig Angaben über das Vorkommen in Bestandsmilch, die von den Milcherzeugern an die Molkereien zur weiteren Verarbeitung geliefert wird. In der vorliegenden Arbeit sollte daher eine größere Anzahl von Rohmilchproben aus den Hofbehältern zahlreicher landwirtschaftlicher Milcherzeugerbetriebe

be aus dem Einzugsgebiet des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes in Aulendorf untersucht werden, um Aufschluß über das Vorkommen und den Verbreitungsgrad von L.m. in roher Kuhmilch vor Anlieferung an die Molkereien zu erhalten, Kontaminationsquellen aufzudecken und eventuell die Abhängigkeit von der Fütterung der Kühe, insbesondere von der Silage zu prüfen.

2. SCHRIFTTUM

2.1 Taxonomische Einteilung von Listerien

Nachdem MURRAY et al. (1926) L.m. als Erreger einer enzootischen Erkrankung bei Kaninchen isoliert und unter dem Namen "*Bacterium monocytogenes*" (inspiriert durch die Beobachtung einer Monozytose in peripherem Blut bei erkrankten Tieren) beschrieben haben, fand PIRIE (1927) in Südafrika bei Wüstenmäusen die gleiche Keimart und nannte sie "*Listerella hepatolytica*", bzw. etwas später (1940) "*Listeria monocytogenes*".

Spätere Studien dieses Keimes brachten die Erkenntnis, daß die Gattung *Listeria* viel heterogener ist, als ursprünglich angenommen wurde. Besonders in den letzten Jahren machten die Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet eine neue taxonomische Einordnung der verschiedenen *Listeria*-Arten notwendig (SEELIGER, 1981; SEELIGER et al., 1981 und 1982; ROCOURT und GRIMONT, 1983; ROCOURT et al., 1983a und 1983b; SEELIGER et al., 1984; ROCOURT und SEELIGER, 1985). Genetische Studien an vielen L.m.-Stämmen zeigten, daß diese Spezies fünf genomische Gruppen enthält und jede von dieser eine eigene Art repräsentiert (SEELIGER et al., 1984). In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (SEELIGER und JONES, 1986) ist das Genus *Listeria* mit acht Spezies aufgelistet. Neben den zwei pathogenen Arten - *L.monocytogenes* und *L.ivanovii*, sowie drei tierexperimentell apathogenen Arten - *L.innocua*, *L.seeligeri* und *L.welshimeri*, sind noch drei weitere "Spezies incertae sedis" ge-

nannt, deren taxonomische Position noch geklärt werden soll - *L.grayi*, *L.murrayi* und *L.denitrificans*. Nach ROCOURT (1986) soll die letzte Art - *L.denitrificans* - einem neuen Genus zugeordnet werden.

2.2 Eigenschaften von Listerien

2.2.1 Morphologische und biochemische Eigenschaften

SEELIGER (1961) gab in seinem Buch "Listeriosis" die heute noch gültige ausführliche Beschreibung von *L.m.* als kleines, grampositives, sporen- und kapselloses, bewegliches, kokkoides Stäbchen mit abgerundeten Enden, 0,5-2 μm lang. Eine ausgeprägte Mobilität im frischen Nativpräparat ist ein wesentliches Merkmal, besonders bei einer Züchtungstemperatur von 20-25°C (GRAY und KILLINGER, 1966). Bei guten Wachstumsbedingungen bildet *L.m.* peritrich angeordnete Geißeln aus (SEELIGER und WELSHIMER, 1974). Die Begeißelung ist von Züchtungstemperatur und Nährboden abhängig (LEHNERT, 1964). Im Grampräparat findet man kokkoide Stäbchen Diplo- und Kurzkettenformen (GRAY und KILLINGER, 1966; SEELIGER und WELSHIMER, 1974).

Auf festen Nährböden bildet *L.m.* bei aeroben und mikroaeroben Bedingungen kleine, runde, feuchtglänzende, anfangs durchsichtige, später grau-weiße, opake Kolonien mit einem Durchmesser von 0,2-0,4 mm nach 24 h, bzw. 2-6 mm nach längerer Bebrütung (SEELIGER und LINZENMEIER, 1953). Die auf farblosen, durchsichtigen Medien gewachsene Kolonien zeigen bei Schrägdurchleuchtung nach HENRY (1933) eine charakteristi-

sche blau-grüne Farbe und eine feine Textur (GRAY, 1962; BØJSEN-MØLLER, 1963; ERREBO LARSEN, 1969). Auf Blutagar gewachsene Kolonien sind mit einem schmalen hämolytischen Hof umgeben (SEELIGER, 1958; WELSHIMER, 1968), wobei der Hämolysegrad abhängig von Wachstumsbedingungen (GRAY und KILLINGER, 1966), Art des Blutes, Qualität des Nährbodens und Alter der Stämme (LEHNERT, 1964) variieren kann (SEELIGER und WELSHIMER, 1974).

Die Hämolyseeigenschaft ist noch bei zwei weiteren *Listeria*-Arten bekannt: bei *L.seeligeri* (schwach) und bei *L.ivanovii* (stark ausgeprägt).

Optimale Wachstumsbedingungen sind bei Temperaturen zwischen 30°C und 37°C und bei pH-Werten von 6-9 (SEELIGER und JONES, 1986) gegeben. Eine diagnostisch wichtige Eigenschaft von *L.m.* ist die Vermehrungsfähigkeit bei niedrigen Temperaturen, was bei der sogenannten "Kälteanreicherung" bei 4°C genutzt wird (GRAY et al., 1948).

Die biochemische Aktivität der *Listeria*-Arten ist nicht ausgeprägt. Tabelle 1 zeigt einige charakteristische Reaktionen nach Angaben von SEELIGER und JONES (1986).

Viele Reaktionen sind allen Spezies gemeinsam: Katalase-positiv, Oxidase-negativ, Methylrot-positiv, keine Indol-Produktion, Spaltung von zahlreichen Kohlenhydraten mit Säurebildung ohne Gas. Eine Unterscheidung zwischen den Arten ist nach ROCOURT et al. (1983) und ROCOURT (1986) mit wenigen Schlüsselreaktionen möglich: Nitrat-Reduktion, Fermentation von Mannit, Hämolyseverhalten einschließlich

CAMP-Test mit *Staphylococcus aureus* und *Rhodococcus equi*, Säurebildung aus D-Xylose (s. Abb. 3).

Die Kohlenhydratspaltung mit Säurebildung ist bei den einzelnen *Listeria*-Arten unterschiedlich (s. Tabelle 2), aber auch zwischen Stämmen dergleichen Spezies wurden unterschiedliche Reaktionen beobachtet (SEELIGER und WELSHIMER, 1974; ROCOURT et al., 1983b).

Tabelle 1 : Einige charakteristische biochemische Eigenschaften der Arten der Gattung *Listeria*, nach Angaben von SEELIGER und JONES (1986)

	L.mono- cyto- genes	L.in- nocua	L.see- ligeri	L.wel- shimeri	L.liva- novii	L. grayi	L.mur- rayi	L.deni- trificans
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-
Methylrot- Reaktion	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer- Reaktion	+	+	+	+	+	+	+	-
Indol-Produktion	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratreduktion	-	-			-	-	+	+
β -Hämolys	+	-	+	-	+	-	-	-
CAMP-Test (<i>S.aureus</i>)	+	-	+	-	-	-	-	-
CAMP-Test (<i>R.equi</i>)	-	-	-	-	+	-	-	-
Harnstoff- Hydrolyse	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse von:								
Zellulose	-	-			-	-	-	+
Hippurat	+	+			+	-	-	-
Stärke	d	d			-	-	-	+
Phosphatase	+	+			+	+	+	-

+ = positive Reaktion

- = keine Reaktion

d = differentes Verhalten bei verschiedenen Stämmen

Tabelle 2 : Verhalten von Listerien gegenüber verschiedenen Kohlenhydraten, nach Angaben von SEELIGER und JONES (1986)

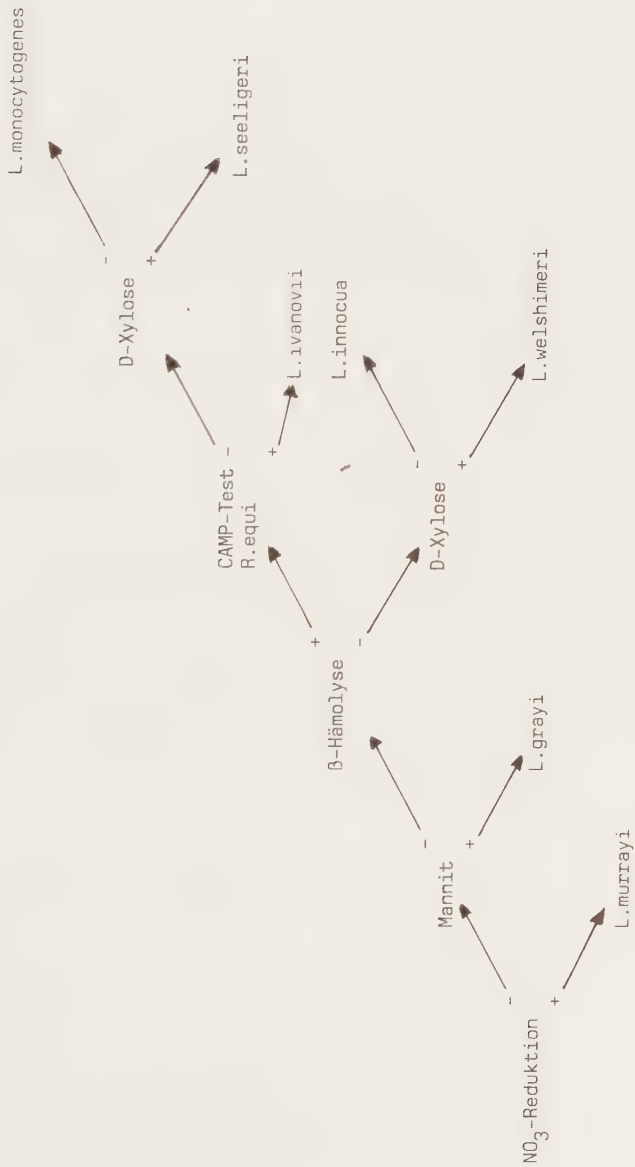
	L.mono- cyto- genes	L.in- nocua	L.see- ligeri	L.wel- shimeri	L.iva- novii	L. grayi	L.mur- rayi	L.deni- trificans
Glukose	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
Äskulin	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-			-	-	-	+
Dextrin	d	-			-	+	+	+
Galaktose	d	-			d	+	+	+
Laktose	d	+			+	+	+	+
Glykogen	-	-			-	-	-	+
D-Lyxose	-	-			-	+	+	
Mannit	-	-	-	-	-	+	+	-
Melibiose	-	-			-	-	-	+
L-Rhamnose	+	d	-	d	-	-	d	-
D-Xylose	-	-	+	+	+	-	-	+
Sukrose	-	d			d	-	-	+
Sorbit	d	-			-	-	-	-

+ = Kohlenhydratspaltung mit Säurebildung

- = keine Kohlenhydratspaltung

d = differentes Verhalten bei verschiedenen Stämmen

Abbildung 3 : Biochemische Differenzierung der *Listeria*-Spezies
nach ROCOURT (1986)



2.2.2 Tenazität

Listerien zeigen eine hohe Tenazität in der Außenwelt. Die Einwirkung tiefer Temperaturen von -20°C bis -75°C führt beim langsamen Gefriervorgang zu keiner Schädigung der Keime (SEELIGER, 1958). Lyophilisierte Kulturen hielten sich über 20 Jahre lebensfähig (RHOADES, 1970). Im Rindfleisch bei -10°C überlebten die Keime trotz mehrmaligem Auftauen über 1,5 Jahre (SIELAFF, 1966). Verseuchte Weiden blieben trotz Sonneneinstrahlung über Monate kontaminiert (BIESTER und SCHWARTE, 1939). Am Stroh konnte LEHNERT (1960) L.m. noch nach 207 Tagen und in der Ackererde nach 11 Monaten bis über 2 Jahren kultivieren. Im Teich- und Flußwasser wiesen ANNAGIEV und AKHMEDOV (1970) L.m. nach 325 Tagen bei 37°C und nach 750 Tagen bei $2-5^{\circ}\text{C}$ nach. Im Kot und in Silagesuspension bei 5°C konnte DIJKSTRA (1975) L.m. über 10-12 Jahre nachweisen sowie in Hirnsuspension bei 5°C bis 16 Jahre (während dieser Zeit wurde das kontaminierte Material in Tryptose-Phosphat-Bouillon bei 5°C aufbewahrt).

SIELAFF (1966) impfte Listerien in reines Kochsalz ein und züchtete sie nach mehr als 150 Tagen wieder heraus. Die Erreger behielten nach dieser Zeit für Mäuse ihre volle Virulenz. Aus einer flüssigen Kultur mit 22% NaCl gelang dem Autor der Nachweis von L.m. noch nach 46 Tagen. Er stellte auch fest, daß die übliche NaCl-Konzentration für Pökellösung in der Fleischindustrie die L.m.-Keime nicht abtötet. Nach Angaben von SEELIGER (1961) überlebten einige L.m.-Stämme über ein Jahr in einer 16%iger NaCl-

Lösung bei pH 6,0. Neuere Untersuchungen von CONNER et al. (1986) über das Wachstum von L.m. im Krautsaft zeigten eine nachlassende Vermehrungsfähigkeit der Keime bei einer NaCl-Konzentration von $\geq 2\%$ bei 30°C, sowie eine 90%ige Keimreduzierung bei 5°C und einem NaCl-Gehalt bis 5% innerhalb von 70 Tagen. Die Autoren stellten weiter das Überleben der Keime bei pH 4,8 bis zu 14 Tagen bei 30°C bzw. bis zu 49 Tagen bei einer Temperatur von 5°C fest.

Die Angaben über die Wärmeresistenz sind in der Literatur sehr unterschiedlich.

DEDIÉ (1955) und DEDIÉ und SCHULZE (1957) stellten fest, daß L.m. in künstlich kontaminierten Milchproben bei Temperaturen von 65-75°C nach 10-40 Sekunden und bei 85°C schon innerhalb 1 Sekunde abgetötet wurden. Versuche von BEARNS und GIRARD (1958) in denen steriler Milch unterschiedliche Listerienmengen zugegeben worden waren zeigten, daß L.m. bei einer Konzentration von 5×10^4 Keime/ml Milch eine Erhitzung von 61,7°C über die Dauer von 35 Minuten überlebte, während 5×10^3 L.m./ml Milch abgetötet wurden.

Aus Untersuchungen von DONKER-VOET (1963a) geht hervor, daß L.m. in der Milch natürlich infizierter Kühe eine Erhitzung von 62,3°C für 15 Sekunden nicht überleben.

Nach Angaben von SEELIGER und WELSHIMER (1974) wurde der Wärmetotpunkt für L.m. bei 58-59°C innerhalb von 10 Minuten erreicht.

BRADSHAW et al. (1985) berichteten, daß eine Erhitzung von 71,1°C für 15 Sekunden ausreichen würde, um theoretisch 10^{15} L.m.-Keime abzutöten.

DONNELLY et al. (1986) stellten experimentell fest, daß L.m. bei einer Konzentration von 5×10^8 / ml in der Vollmilch bei 62°C Erhitzung über eine Zeit von

24 bis 60 Sekunden abgetötet wurde.

BUNNING et al. (1986 und 1988) untersuchten die Hitzeresistenz von freisuspendierten Listerien und parallel dazu eine Suspension von intrazellulär phagozytierten Keimen in Rohmilch, bei gleichen Bedingungen. Das Experiment ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Suspensionen. Man konnte daraus schließen, daß eine intrazelluläre Lokalisation des Keimes nicht vor einer Abtötung durch Erhitzung schützt.

Über einen Versuch zur Hitzeresistenz von L.m. in der Rohmilch berichteten auch TERPLAN et al. (1986). Eine Abtötung der Keime in der Konzentration von 9×10^4 bzw. 10^5 /ml Milch erfolgte bei 63°C nach 30 Sekunden

BRADSHAW et al. (1987) führten Erhitzungsversuche bei Temperaturen zwischen 52,2 und 79,4°C mit einem frei in Milch suspendierten L.m.-Stamm ($\text{ca. } 1 \times 10^5$ Keime/ml Milch) durch. Die registrierten $D_{71,1^\circ\text{C}}$ -Werte für Milchproben reichten von 0,9 bis 2,7 Sekunden. Nach Meinung der Autoren überleben die in der Milch frei vorliegenden L.m.-Keime die Pasteurisierung nicht, vorausgesetzt, daß sie ordentlich durchgeführt wird. Diese Auffassung teilen auch DONNELLY et al. (1987). In ihrer Studie wurde die Hitzeresistenz von drei L.m.-Stämmen in offenen und verschlossenen Röhrchen miteinander verglichen. Alle L.m.-Stämme in der Milch wurden bei Verwendung von verschlossenen Röhrchen schnell inaktiviert. Die geschätzten $D_{62^\circ\text{C}}$ -Werte lagen zwischen 0,1-0,4 Minuten für alle drei getesteten Stämme. Demgegenüber konnte eine vollständige Abtötung von L.m.-Populationen innerhalb von 30 Minuten bei 62°C nicht erreicht werden, wenn of-

fene Teströhrchen benutzt wurden; somit ist diese Methode zur Messung der Hitzeresistenz von L.m. nicht geeignet.

Die Ergebnisse einer Untersuchung von DOYLE et al. (1987) zeigen an, daß L.m.-Keime in zellreicher Milch die "high temperature, short-time" (HTST)-Pasteurisierung überleben können. Von künstlich infizierten Kühen stammende L.m.-haltige, zellreiche Milch, in der die Keime z.T. phagozytiert waren, wurde bei 71,7-73,9°C 16,4 Sekunden lang, bzw. bei 76,4-77,8°C 15,4 Sekunden lang erhitzt. L.m. konnte in 6 von 9 Pasteurisierungsversuchen bei 71,7-73,9°C, jedoch in keinem der drei Versuchen bei 76,4-77,8°C isoliert werden.

Unlängst durchgeführte Experimente von BECKERS et al. (1987) zeigen, daß L.m.-Keime ($1,8 \times 10^4$ Zellen/ml Milch) eine Erhitzung bei 67°C über 20 Sekunden oder mehr nicht überleben. Die Autoren schloßen daraus, daß die übliche Pasteurisierung von Milch eine Kontamination von Weichkäsen mit Listeria-Arten verhindert, vorausgesetzt, daß keine Rekontamination während der Produktion stattfindet.

2.3 Nachweis von Listerien

2.3.1 Allgemeines zur Isolierung

Listeria-Keime wurden sowohl aus der Umwelt (Boden, Vegetation usw.) isoliert (GRAY und KILLINGER, 1966; WELSHIMER und DONKER-VOET, 1971; WEIS und SEELIGER, 1975; GRØNSTØL, 1979; AMTSBERG, 1980; RALOVICH, 1984), als auch im Kot bzw. Stuhl gesunder Tiere und Menschen nachgewiesen (DONKER-VOET, 1963; KAMPELMACHER und VAN NOORLE JANSEN, 1969, 1972a und 1980; KAMPELMACHER et al., 1972 und 1976; GRØNSTØL, 1980; RALOVICH, 1984). Sie lassen sich gut in einfachen Nährmedien zur Vermehrung bringen (SEELIGER, 1961). In der Fachliteratur ist über eine Vielzahl von Nähr- und Anreicherungsmedien und von Isolierungsmethoden berichtet worden (LEHNERT, 1964; SEELIGER et al., 1970; OBIGER und SCHOENBERG, 1973; DGHM, 1982; RALOVICH, 1984; SEELIGER und JONES, 1986). Verschiedene Nährbodenkombinationen und chemische Zusätze wurden in zahlreichen Labors versucht, um eine brauchbare und schnelle Methode für Listerien-Isolierung herauszufinden. Die Isolierungsergebnisse bei der Anwendung einiger dieser Verfahren waren in den verschiedenen Labors unterschiedlich, was vermutlich auf Qualitätsunterschiede bei den Reagenzien, geringe Unterschiede in der Zusammensetzung der Nährböden und der Anwendungstechniken zurückzuführen ist (SEELIGER und JONES, 1986).

Die Auswahl der Nährböden und des Isolierungsverfahrens ist grundsätzlich von der bakteriellen Belas-

stung des Untersuchungsmaterials abhängig (DGHM, 1982; RALOVICH, 1984). Hierbei unterscheidet man zwei Probengruppen:

1. Proben aus Material, das wahrscheinlich nur mit Listerien kontaminiert und sonst keimfrei ist, wie Blut, Liquor, Mekonium, Zellgewebe usw.
2. Proben aus mit Begleitkeimen verunreinigtem Material wie Kot, Vaginalsekret, Abwasser, Lebensmittel, Viehfutter, Bodenproben usw.

Zur Isolierung von L.m. aus den Proben der ersten Gruppe genügen einfache Nährmedien wie Nährbouillon und Schafblut- oder Tryptose-Agar (DGHM, 1982). Eine Anzüchtung auf selektiven Nährmedien ist nicht erforderlich (RALOVICH, 1984). Durchsichtiger Tryptose-Agar ist nach GRAY und KILLINGER (1966) und SEELIGER et al. (1970) sehr geeignet.

Nach 24 h oder 48 h Bebrütung bei 37°C kann man die gewachsenen Kolonien unter Anwendung der Schräglichtmethode nach HENRY (1933) als kleine, durchsichtige, blau-, blau-grau- oder blau-grün-irisierende Kolonien erkennen (SEELIGER et al., 1970). Bei der Kultivierung auf Blutagar entwickeln L.m.-Stämme eine β -hämolytische Aktivität gegen Erythrozyten von Schaf, Rind, Pferd, Kaninchen und Mensch (SEELIGER und JONES, 1986). Nach 48 h-Bebrütung bei 37°C wachsen 0,2-2 mm kleine, grau-weiße Kolonien, umgeben von einem schmalen hämolytischen Hof (SEELIGER, 1961; BØJSEN-MØLLER, 1972; SEELIGER und WELSHIMER, 1974).

Bei mit Mischflora verunreinigtem Material aus der

zweiten Gruppe ist zur Wachstumsunterdrückung der Begleitkeime und zur Verbesserung der Isolierungsergebnisse ein Zusatz von Hemmstoffen in den Medien (SEELIGER et al., 1970), oder die Anwendung der Anreicherungstemperatur um 4°C - "Kälteanreicherung" - (GRAY et al., 1948; GRAY und KILLINGER, 1966) notwendig. Beide Verfahren können kombiniert werden und haben sich bewährt (LEHNERT, 1964; WELSHIMER, 1968; ERREBO-LARSEN, 1969; SEELIGER et al., 1970; KAMPELMACHER et al., 1972; DIJKSTRA, 1975; RALOVICH, 1984). Stark verunreinigte Proben werden zuerst in einem selektiven Flüssignährboden angereichert und anschließend auf einem festen Selektivagar weiterkultiviert.

Es sind verschiedene Zusatzstoffe hinsichtlich ihrer hemmenden Wirkung auf die Begleitkeime in den Nährmedien getestet worden. Jahrelange Erfahrungen auf diesem Gebiet haben gezeigt, daß der Zusatz von Acridinfarbstoffen (Trypaflavin oder Acriflavin) und Nalidixinsäure in den Nährmedien für die selektive L.m.-Isolierung unentbehrlich ist (BEERENS und TACHON-CASTEL, 1966; BOCKEMÜHL et al., 1971 und 1974; RALOVICH et al., 1971; KAMPELMACHER und VAN NOORLE JANSEN, 1972a; KAMPELMACHER et al., 1972; DIJKSTRA, 1975 und 1976).

2.3.2 Isolierung aus der Milch

Bisher gibt es keine Standardmethode für die Isolierung von L.m. aus Milch und Milcherzeugnissen. LOVETT et al. (1985) berichten über ein Isolierungsverfahren, das bei Milch erfolgreich getestet wurde. 25 ml der Milchprobe wurden zuerst in 225 ml eines selektiven Anreicherungsmediums bei 30°C bebrütet, dann nach 24 h und nochmals nach 48 h, nach einer kurzzeitigen Verdünnung mit 0,5% KOH-Lösung, auf einen Selektivagar ausgestrichen und für weitere 48 h bei 35°C inkubiert. Danach wurden die verdächtigen Kolonien unter der Schräglichtbeleuchtung nach HENRY (1933) untersucht und in einer Reihe biochemischer Tests identifiziert. In einer späteren Studie empfahlen die Autoren einen weiteren Ausstrich nach 7 Tagen Bebrütung auf dem Selektivagar, um die Isolierung von geschädigten Listerien aus Milch möglicherweise zu verbessern (LOVETT et al., 1987). In dieser letzten Studie wurde gleichzeitig eine quantitative Bestimmung der Listerienkonzentration in den Sammeltank-Proben vorgenommen, wobei sich gezeigt hat, daß die Listerien in der Sammelmilch, falls vorhanden, in einer Konzentration von einem Keim pro ml Milch oder weniger vorlagen. Es wurde gleichzeitig festgestellt, daß die Empfindlichkeit des verwendeten Anreicherungsverfahrens zur Isolierung von Listerien aus Rohmilch bei weniger als einem Bakterium pro ml Milch lag.

Eine ähnliche Isolierungsmethode für den Nachweis von Listerien in Milch wurde von DOYLE und SCHOENI (1986) angewandt. 25 ml der Milchprobe wurde in 100 ml eines selektiven flüssigen Anreicherungsmediums

unter Taumeln bei mikroaeroben Bedingungen 24 h bei 37°C bebrütet, dann auf einen Selektivagar ausgestrichen und unter gleichen Bedingungen nochmals 24 h bebrütet. Die gewachsenen verdächtigen Kolonien wurden dann mikroskopisch und biochemisch identifiziert.

In Anlehnung an die Methode von LOVETT et al. (1985 und 1987) erarbeitete die Food and Drug Administration (FDA) in den USA ein Isolierungsverfahren, das vom Bundesgesundheitsamt in Berlin und vom Bundesministerium für Jugend, Familie und Gesundheit für die Lebensmitteluntersuchungen auf L.m.-Vorkommen empfohlen wurde.

Unlängst haben FARBER und SPEIRS (1986) einen Immuntest (ELISA) zur Erkennung von L.m. in Rohmilch entwickelt, bei dem monoklonale Antikörper mit bestimmten Antigen-gruppe von L.m. reagieren.

2.3.3 Identifizierung

Umfassende Untersuchungen vieler *Listeria*-Stämme hinsichtlich Herkunft und Vorkommen ergaben, daß pathogene und apathogene *Listeria*-Spezies in der Umwelt gleichermaßen vorkommen (ROCOURT und SEELIGER, 1985). Die Beurteilung der Hämolyse und des biochemischen Reaktionsspektrums ermöglichen die Abgrenzung von *Listeria*-Arten untereinander (AMTSBERG, 1980; DGHM, 1982; RALOVICH, 1984; ROCOURT, 1986; SEELIGER und JONES, 1986). Als ergänzende Identifikationsmethode stehen die Serologie und der Pathogenitätsnachweis zur Verfügung. Gegenüber *Coryne*-, *Lakto*- und *Rot*-

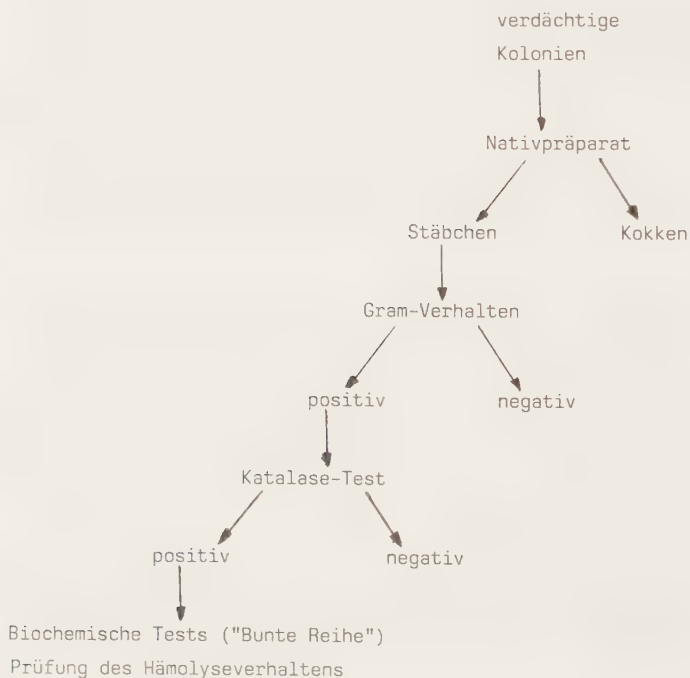
laufbakterien sowie Enterokokken sind Listerien u.a. morphologisch, aufgrund ihrer Beweglichkeit bzw. anhand der Katalasebildung abzugrenzen.

In der Abbildung 4 ist ein Identifikationsschema für Listerien in der Milch und Milchprodukten nach einem Vorschlag der USA-Behörde Food and Drug Administration (FDA) vom Januar 1986 in Anlehnung an TERPLAN et al. (1986), dargestellt. Die Methode basiert auf der Beurteilung der morphologischen Eigenschaften der Kolonien nach Anzüchtung in selektiven Nährmedien, der Hämolysefähigkeit der Kulturen auf-Blutagar und den biochemischen Reaktionen der L.m.-Kulturen, vor allem anhand der Fermentation einiger Zucker. Nach Angaben der FDA wird die Gas- und Säurebildung aus Glucose, Rhamnose, Aesculin, Maltose, Mannit und Xylose geprüft. Zu diesem Zweck dient die sogenannte "Bunte Reihe", wobei unter anderen Tests in ein Grundmedium jeweils eine von den genannten Zuckerarten als steril-filtrierte Lösung zugefügt werden. Nach den Angaben der FDA ist mit diesem Verfahren eine eindeutige Identifikation von Listerien möglich.

Von einigen Autoren wird auch ein Schnelltest zur Identifizierung von L.m. mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern beschrieben, wobei gleichzeitig eine Serotypbestimmung des Erregers möglich sei (SMITH et al., 1960; MILLER und MURASCHI, 1962). Dieses Verfahren wurde 1977 von KHAN et al. mit künstlich mit L.m. beimpften Proben pasteurisierter Milch getestet. Es stellte sich heraus, daß die in der Milch vorhandenen Fremdkeime eine Interpretation der Ergebnisse erschwerten und weitere Kontrolluntersuchungen not-

wendig seien. Nach DONNELLY (1986) ist eine solche Methode besser geeignet für eine L.m.-Identifikation in kontaminiertem klinischen Material, in dem sich Keime fast in Reinkultur befinden, wie Blut, Liquor usw.

Abbildung 4 : Differenzierung Listerien-verdächtiger Kolonien (in Anlehnung an die Methode der FDA vom Januar 1986), nach TERPLAN et al. (1986)



2.4 Zum Vorkommen von Listerien

2.4.1 Beim Tier

L.m. ist praktisch bei allen Wild-, Zoo- und Haustieren, Nagetieren, Vögeln, Kaltblütern und Insekten festgestellt worden (SEELIGER, 1961; GRAY und KILLINGER, 1966; WEIS und SEELIGER, 1975; AMTSBERG, 1980). Bei den Haustieren erkrankten an Listeriose Schafe und Rinder am häufigsten, meist im Zusammenhang mit der Verfütterung minderwertiger Silage (GRAY, 1960; LEHNERT, 1964; DIJKSTRA, 1965; HYSLOP, 1975; HADZIMURATOVIC et al., 1983). Bekanntlich kann in der Silage von schlechter Qualität und pH-Werten über 5,6 eine Anreicherung von L.m. erfolgen, was bei der Verfütterung besonders an geschwächte Tiere zu einer Erkrankung führen kann. Inapparente Infektionen klinisch gesunder Tiere und damit temporäre Keimausscheidung durch Nasensekret, Kost und Milch sind möglich (LEHNERT, 1964; DIJKSTRA, 1965; KAMPELMACHER und VAN NOORLE JANSEN, 1969; HOFER, 1984). Eine von der Silagefütterung abhängige saisonbedingte Schwankung der Zahl an Listeriose erkrankter Wiederkäuer wurde beobachtet - in den Monaten Januar bis Mai ist die Erkrankungstendenz steigend, danach wieder rückläufig (DIJKSTRA, 1965; SEELIGER et al., 1968; WEIS, 1973; MAUPAS et al., 1975).

Die Listeriose tritt bei Wiederkäuern allgemein selten und sporadisch auf, dispositionelle und konstitutionelle Faktoren wie Stress, Gravidität, Immunsup-

pression, andere Krankheiten usw., begünstigen die klinische Manifestation einer L.m.-Infektion (GRAY und KILLINGER, 1966; WEIS, 1973; HYSLOP, 1975; AMTSBERG, 1980).

Es werden vier Hauptkrankheitsformen beschrieben:

1. Die zerebrale Form mit Meningoenzephalitis tritt vor allem bei Schafen, sowohl bei erwachsenen Tieren als auch bei Lämmern, auf (BEER et al., 1957; GRAY und KILLINGER, 1966; DIJKSTRA, 1986). Bei Rindern erkranken sowohl die nicht trächtigen Tiere verschiedener Altersgruppen (DIJKSTRA, 1962), als auch die trächtigen Kühe (GROTTKER, 1985). Die Symptome sind nicht sehr spezifisch und werden als Bewußtseinsstörungen, Muskeltremor, Konjunktivitis, Speichelfluß, später Drehung im Kreis, einseitige Facialisparalyse und Verenden der Tiere in wenigen Tagen beschrieben (DIJKSTRA 1962; AMTSBERG, 1980).

2. Die metritische Form ist gekennzeichnet durch Abort oder Frühgeburten ohne zentralnervöse Störungen (AMTSBERG, 1980), sowie Nachgeburtsverhaltungen mit einschließenden Endometritiden (IVANOV, 1962; DIJKSTRA, 1965). Nach Überstandenem Abort können die Tiere wieder befruchtet werden und gesunde Lämmer (Kälber) gebären (IVANOV, 1962).

Die Aborte erfolgen meist gegen Ende der Trächtigkeit, sie wurden am häufigsten in den Monaten Dezember bis April beobachtet (DIJKSTRA, 1986). In einigen Ländern können dadurch in der Schafzucht hohe Verluste ent-

stehen (GRØNSTØL, 1979; GITTER, 1985).

3. Die septikemische Form tritt meist bei Neugeborenen oder Jungtieren auf. Sie zeigt einen unspezifischen Verlauf mit hohem Fieber, Durchfall, Apathie und Tod nach wenigen Stunden (GRAY und KILLINGER, 1966; AMTSBERG, 1980). Diese Form kann auch bei erwachsenen Schafen auftreten (IVANOV, 1962).

4. Die Listeriose-Mastitis wurde bei laktierenden Kühen sehr selten gefunden (WRAMBY, 1944; DE VRIES und STRIKWERDA, 1956; GITTER et al., 1980).

Allgemein steht bei den Wiederkäuern die zerebrale Form im Vordergrund (AMTSBERG, 1980)

2.4.2. In Milch

Die Ausscheidung von L.m. in Milch von Kühen, die an einer Listerien-Mastitis erkrankten, wurde von mehreren Autoren beobachtet (WRAMBY, 1944; PÔTEL, 1953/54; DE VRIES und STRIKWERDA, 1956; DEDIE, 1955; DONKER-VOET, 1962; JENSEN und ERREBO-LARSEN, 1973; ERREBO LARSEN und JENSEN, 1977; NIELSEN, 1985). Es handelte sich jedoch um Einzelfälle. In einem Fall wurde der Erreger über 9 Monate lang mit der Milch aus allen Eutervierteln ständig ausgeschieden (DONKER-VOET, 1962).

Bei Untersuchungen von Rohmilchproben klinisch ge-

sunder Rinder ließ sich L.m. ebenfalls sporadisch isolieren. SIPKA (1961) fand bei einer importierten Kuh L.m. in Milch, ohne daß eine Mastitis festgestellt werden konnte.

LEHNERT (1964) untersuchte 87 Rohmilchproben (4/4-Gemelke) aus einer mit Silage gefütterten Rinderherde. Aus einer Probe konnte er L.m. isolieren.

Eine umfangreiche Untersuchung von Rohmilchproben von 1004 Kühen aus 25 landwirtschaftlichen Betrieben während der Silagefütterungszeit führte SCHULZ (1967) durch. Es gelang ihm der Listeriennachweis in Milchproben von 10 Kühen, wobei nur in zwei Fällen eine katarrhalische Mastitis vorlag, die als Galtinfektion geklärt wurde. Eine Kontamination aus der Umwelt konnte nicht ausgeschlossen werden. Eine einmalige Nachuntersuchung der Milch von den betreffenden Kühen nach neun bis fünfzehn Tagen verlief negativ.

AMTSBERG et al. (1969) konnten in vier (2%) von 197 Milchproben, aus Beständen mit Grassilagefütterung stammend, L.m. nachweisen. Bei den betreffenden Tieren hatte man keine Euter- oder Milchveränderung feststellen können. Eine sekundäre Verunreinigung war jedoch nicht auszuschließen.

Untersuchungen von Rohmilchproben 36 L.m.-seropositiver klinisch gesunder Kühe aus einigen Herden in Cordoba brachten dagegen sehr viel höhere Nachweisquoten. Bei 13 (36%) Kühen wurde L.m. in der Milch gefunden (VIZCAINO und GARCIA, 1974).

Einige Autoren untersuchten Milch in Beständen, in denen einzelne Tiere an Listeriose erkrankt waren bzw. in denen Listerien-Aborte vorgekommen waren, auf L.m. SIELAFF (1966) konnte in etwa 2000 Milchpro-

ben aus verschiedenen Beständen keine Listerien nachweisen.

DIJKSTRA (1965) fand bei 26 (16%) von 163 Kühen, die aufgrund von Listeriose abortiert hatten, L.m. in der Milch. In einer anderen Studie konnte der Autor L.m. in 72 von 938 Viertelgemelksproben (7,7%) von Kühen mit Listeriose-Aborten nachweisen (DIJKSTRA, 1975).

STAJNER (1971) untersuchte die Ausscheidung von L.m. in der Milch von 10 Kühen, bei denen durch vorangegangene Untersuchungen Listerien in Uterusbiopsieproben oder in abortierten Foeten nachgewiesen worden waren. In den Milchproben von 6 dieser Tiere waren Listerien in unregelmäßigen Zeitabständen nachweisbar, bei zwei von ihnen sogar über einen Zeitraum von 12 Monaten, auch über die Trockenperiode und das erneute Abkalben hinweg.

In einer ähnlichen Arbeit gelang KOVINCIC et al. (1979) bei 27 (3%) von 845 Kühen die L.m.-Isolierung aus der Milch. Bei den 16 der 27 Kühe mit positivem Befund in der Milch gab es keine Anzeichen einer Mastitis.

Über das L.m.-Vorkommen in Rohmilch aus Sammeltanks sind in der Literatur nur wenig Angaben zu finden. Nach dem Auftreten einiger Fälle von Listeriose bei schwangeren Frauen im Raum Halle, bei denen unabgekochte Molkereimilch oder sogar rohe Kuh- oder Ziegenmilch als Infektionsquelle in Betracht gezogen wurde, untersuchte PÖTEL (1953/54) 100 Rohmilchproben aus der Sammelmilch einer Molkerei in Halle auf Anwesenheit von L.m., jedoch mit negativem Ergebnis. Er betonte aber, daß die Verunreinigungen der Proben durch saprophytäre Keime sehr groß gewesen sei und

daher eine Kontamination der Milch mit Listerien nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte.

DOMINGUEZ et al. (1985) untersuchten insgesamt 95 Rohmilchproben, die innerhalb von 16 Monaten (1982-83) aus einem Großbehälter einer Zentralmolkerei in Madrid, die von den Regionalmolkereien aus West- und Zentralspanien beliefert wurde, entnommen worden waren. Aus 43 Proben (45,3%) soll L.m. isoliert worden sein. Auch andere Listeria-Arten seien - teilweise in hohem Prozentsatz - nachgewiesen worden . (Diese Ergebnisse sollen unter Fachleuten sehr kritisch bewertet werden).

Im Zusammenhang mit einem Listeriose-Ausbruch bei Menschen in den USA (FLEMING et al., 1985), bei dem der Konsum von Vollmilch bzw. Milch mit einem Fettgehalt von 2% aus einer Molkerei als Ursache angesehen wurde, prüfte man Rohmilchproben aus dem Einzugsgebiet der Molkerei (HAYES et al., 1986). Von 121 Rohmilchproben wurde in 15 (12%) L.m. nachgewiesen. In dem fraglichen Gebiet waren vor dem Ausbruch der Krankheit 4 Kühe an Listeriose erkrankt gewesen, allerdings traten zum Zeitpunkt der Milchuntersuchung keine Listeriosefälle mehr auf. Der bei den Erkrankten und aus klinischem Material isolierte Phagentyp konnte allerdings weder in der pasteurisierten Milch noch in der rohen Milch der betreffenden Farmen nachgewiesen werden

DOYLE und SCHOENI (1986) überprüften 50 Rohmilchproben aus Sammel tanks einiger Milchfarmen in den USA auf L.m.-Vorkommen, mit negativem Ergebnis. Nach Angaben von GLEDEL (1986) wurden in Frankreich im Januar 1986 im Rahmen der Lebensmittelüberwa -

chung 86 Sammelmilchproben aus 13 Departements auf L.m.-Vorkommen nach der FDA-Methode (s. 2.3.2 und 2.3.3) untersucht. Aus 10 Proben wurde L.m. isoliert (11,6%). Zwischen Juli und Oktober 1986 untersuchte man weitere 337 Tankmilchproben mit derselben Methode. In 14 Proben (4,15%) konnte L.m. identifiziert werden. Andere Listeria-Spezies wurden ebenfalls gefunden.

Auch LOVETT et al. (1987) untersuchten insgesamt 650 Rohmilchproben aus Sammeltanks von mehreren Milchfarmen aus drei Gebieten (Kalifornien, Tri-State area und Massachusetts), in den USA. Aus 27 Proben (4,2%) gelang die L.m.-Isolierung, wobei in Kalifornien der Nachweis in keinem Fall gelang. Nach Meinung der Autoren liegt die Menge der Listerien in der Sammelmilch aus den Tanks wahrscheinlich unter einem Keim pro ml Milch.

In Tabelle 5 sind die zitierten Untersuchungen von Sammelmilchproben auf L.m.-Vorkommen zusammengefaßt.

Über das Vorkommen von L.m. in der Rohmilch von Schafen und Ziegen ist bisher wenig bekannt. GRØNSTØL (1979) untersuchte die Milch von 106 klinisch gesunden Muttertiere und 10 erstmals trächtigen Schafen. In 43 Muttertierproben und in einer Probe von erstmals trächtigen Schafen wies er L.m. nach.

Die Ergebnisse zweier Untersuchungen von Ziegenmilch auf das Vorkommen von L.m. veröffentlichten LØKEN et al. (1982). Bei der ersten Untersuchung erwiesen sich 30 Proben als listerienfrei; in einer späteren Wiederholungsuntersuchung in der Zeit nach der Ab-

lammung konnte aus 5 von 43 Proben L.m. gezüchtet werden.

Angesichts der zunehmenden Erzeugung von Schaf- bzw. Ziegenmilch ist bei der Bewertung des gesundheitlichen Risikos das Vorkommen von L.m. zu berücksichtigen. Nach einer Mitteilung der Regierung der Bundesrepublik Deutschland zum Schreiben der Kommission der Europäischen Gemeinschaften vom 23.Dezember 1985, mit dem Datum 15.Mai 1986, werden allein in den Mitgliedstaaten der EG jährlich 2,4 Mio. Tonnen Schafmilch und 1,1 Mio. Tonnen Ziegenmilch erzeugt. Davon werden mindestens 274.000 Tonnen Schaf- und 210.000 Tonnen Ziegenmilch an Molkereien geliefert.

Tabelle 6 zeigt eine Zusammenfassung der Untersuchungen über das Vorkommen von L.m. in der Milch einzelner, laktierender und eutergesunder Tiere.

Tabelle 5 : Untersuchungen über das Vorkommen von
L.m. in Rohmilchproben aus Sammel tanks

Anzahl der Proben	Anzahl der L.m.-Isolate	%	Autor
100	0		POTEL (1953/54)
95	43 ?	45,3 ?	DOMINGUEZ et al. (1985)
121	15	12,4	HAYES et al. (1986)
50	0		DOYLE und SCHOENI (1986)
86	10	11,6	GLEDEL (1986)
337	14	4,2	GLEDEL (1986)
650	27	4,2	LOVETT et al. (1987)

Tabelle 6 : Untersuchungen über das Vorkommen von
L.m. in der Milch laktierender, euter-
gesunder Tiere

Anzahl der Tiere bzw. Proben	L.m.-positiv	Autor
A. Kühe		
1	1	SIPKA (1961)
87	1	LEHNERT (1964)
163	28	DIJKSTRA (1965)
2000	0	SIELAFF (1966)
1004	10	SCHULZ (1967)
220	0	AMTSBERG et al.(1969)
197	4	AMTSBERG et al.(1969)
10	6	STAJNER (1971)
845	27	KOVINCIC et al.(1972)
36	13	VIZCAINO und GARCIA (1975)
938	72	DIJKSTRA (1975)
B. Schafe		
106	43	GRØNSTØL (1979)
10	1	Derselbe
C. Ziegen		
30	0	LØKEN et al.(1982)
43	5	Dieselben

2.4.3 Beim Menschen

Die Untersuchungen epidemiologischer Zusammenhänge und die Entwicklung neuer mikrobiologischer Isolierungstechniken, die in kontaminiertem Untersuchungsmaterial die Erkennung und Erfassung auch klinisch gesunder Keimausscheider ermöglichen, weisen darauf hin, daß die humanmedizinische Bedeutung der Listeriose immer größer wird.

In den letzten Jahren nehmen Meldungen über Gruppen-erkrankungen und Listeriose-Ausbrüche weltweit zu, besonders in Nordamerika, aber auch in der Bundesrepublik Deutschland wird von einem vermehrten Auftreten von Listeriose-Erkrankungen berichtet (POTEL, 1983; NIKOLAI-SCHOLTEN et al., 1985).

Das Krankheitsbild beim Menschen stimmt im allgemeinen mit dem bei Tieren überein (POTEL, 1968; SEELIGER, 1971). Es äußert sich hauptsächlich als Meningitis und Sepsis, selten treten lokalisierte Infektionen wie Endokarditis, Endophthalmitis, Hepatitis und Hautinfektion auf (EMMERLING et al., 1986). Am häufigsten erkranken Neugeborene und abwehrgeschwächte ältere Patienten, sowie Schwangere (LIEBE, 1973; HIRSCHL et al., 1980; SEELIGER, 1982; EMMERLING et al., 1986). Spezifische Krankheitssymptome fehlen meistens, so daß nur der Erregernachweis Aufschluß über die Ätiologie und die notwendige Therapie gibt (SEELIGER, 1982).

Die Frage des Infektionsweges ist bisher nicht eindeutig geklärt. Über eine Kontaktübertragung der Krankheit vom kranken Tier auf den Tierarzt (KAMPELMACHER und VAN NOORLE JANSEN, 1980), bzw. von infizierten Tierkörpern auf Schlachthofarbeiter (BØJSEN-MØLLER, 1972) ist berichtet worden. Die unterschiedlichen jahreszeitlichen Erkrankungsgipfel von Menschen und Tieren - Menschen erkranken meist im Sommer und Herbst, Tiere im Winter und Frühjahr (SEELIGER et al., 1968; SEELIGER, 1971), die Tatsache gesunder Keimträger (BØJSEN-MØLLER, 1972; KAMPELMACHER und VAN NOORLE JANSEN, 1972A; ORTEL, 1975; RALOVICH, 1984), sowie die Ubiquität des Keimes sprechen für die Ansicht, daß das Tier als Infektionsquelle nicht im Vordergrund steht und für den Menschen in der Umwelt z.B. über Pflanzen, Erde, Wasser usw. ähnliche Infektionsmöglichkeiten gegeben sind wie für die Tiere (AA von der, 1963; MAUPAS et al., 1975; KAMPELMACHER et al., 1976; RALOVICH, 1984).

Es ist allerdings unbestritten, daß eine Infektion über listerienhaltige Lebensmittel tierischer und pflanzlicher Herkunft denkbar ist. Wegen der Ubiquität des Erregers und der langen Inkubationszeit ist jedoch eine Analyse von Infektionsketten sehr schwierig und erfordert die genaue Untersuchung jedes einzelnen L.m.-Isolats, bevor ein direkter Zusammenhang unterstellt werden kann.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material

Von Juni 1986 bis Mai 1987 wurden insgesamt 1095 Rohmilchproben und 61 Proben aus anderem biologischem Material kulturell auf das Vorkommen von L.m. untersucht. Aus der Tabelle 7 ist die Zusammensetzung des Probenmaterials ersichtlich.

Alle Proben stammten aus Betrieben im Einzugsgebiet des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf (Umkreis etwa 120 km) im Südwesten der Bundesrepublik Deutschland (Südwestfalen). In keinem dieser Bestände wurde vor Versuchsbeginn eine Listeriose-Erkrankung bei den Milchkühen festgestellt. In einem Teil der Betriebe (55,4%) wurde in den Wintermonaten Mais- und/oder Grassilage gefüttert, ansonsten stand die Grünfütterung (Weidegang) im Vordergrund; daneben wurde Kraftfutter (Leistungsfutter) gegeben.

Aus der Tabelle 8 ist die Verteilung des Probeneinganges über den Untersuchungszeitraum ersichtlich. In der Tabelle 9 ist die Fütterungsart in der Zeit der Probenentnahme dargestellt.

Tabelle 7: Übersicht über die Zusammensetzung des
Untersuchungsmaterials

Betriebsart	Anzahl	Probenart	Anzahl
1. Milcherzeuger- Betriebe	635	Bestandsmilch	635
2. Vorzugsmilch- Betriebe	4	a) Viertelgemelke (vier Proben pro Kuh)	68
		b) Mischproben aus vier Viertelge- melken (eine Pro- be pro Kuh)	184
3. Verdachts- Betrieb *	1	Viertelgemelke (vier Proben pro Kuh)	120
4. Einzelgemelks- und Umgebungs- proben aus zwei unter Punkt 1 auf- geführten Betrie- ben	2	a) Viertelgemelke (vier Proben pro Kuh)	88
		b) Kot	22
		c) Silage	4
		d) Heu	2
		e) Futterrübe	1
5. Käsereien	12	Zentrifugenschlamm	32
		Gesamtprobenzahl	1156

* Betrieb mit 15 Milchkühen; Verkabung von zwei Kühen
6-8 Wochen vor Untersuchungsbeginn, Listeriennachweis in
Leber und Niere von einem Foetus

Tabelle 8: Verteilung des Probeneinganges während
des Untersuchungszeitraumes

Zeitraum	Bestandsmilch	Viertelge- melksproben *	Umgebungs- proben	Zentri- fugenschlamm
1986:				
Juni	99	-	-	-
Juli	38	-	-	-
August	-	-	-	-
September	45	114	-	9
Oktober	87	82	-	8
November	-	60	-	5
Dezember	4	116	-	-
1987:				
Januar	176	-	-	10
Februar	124	40	14	-
März	52	44	13	-
April	10	4	2	-
Insgesamt:	635	460	29	32

* Viertelgemelksproben (vier Proben pro Kuh) und Mischproben
aus vier Viertelgemelken (eine Probe pro Kuh)

Tabelle 9: Übersicht über die Fütterungsart
(ohne Kraftfutter) in der Zeit der
Probenentnahme

Fütterungsart	Anzahl der Betriebe	%
Silage	352	55,4
Grünfutter	198	31,2
Heu	85	13,4

3.1.1 Probenentnahme

Die Bestandsproben (Sammelmilch) wurden durch den Wirtschaftskontrolldienst im Rahmen der Lebensmittelüberwachung in den Milcherzeugerbetrieben entnommen. Die Probenentnahme erfolgte mittels steriler Stechheber nach Umrühren der Milch aus der Mitte der Hofbehälter bzw. Hoftanks in sterile 100 ml-Glasfläschchen ohne Konservierungsmittel.

Rohmilchproben aus Vorzugsmilchbetrieben entnahmen beamtete Tierärzte (Staatl. Veterinärämter) nach

Zitzenreinigung und Desinfektion, direkt aus den Eutern der einzelnen laktierenden Kühe.

Die Entnahme der Proben aus dem Verdachtsbetrieb und der unter Punkt 4. der Tabelle 7 genannten Proben habe ich selbst vorgenommen. Aus jedem Euterviertel aller laktierenden Kühe in diesen Betrieben wurden die Milchproben, ebenfalls nach Reinigung und Zitzen-desinfektion, in sterile Glaskolben zu 100 ml entnommen. Die Kot- und Futterproben wurden in Plastikscha-len gefüllt.

Aus 12 Käsereien wurden insgesamt 32 Zentrifugenschlammproben entnommen und in gleichem Verfahren wie die Milchproben auf Anwesenheit von L.m. untersucht.

Alle Proben wurden jeweils gekühlt und unverzüglich (innerhalb von 2-3 Stunden) dem Labor zugestellt, die bakteriologische Untersuchung wurde am Tag des Probeneingangs eingeleitet.

3.2. Medien und Reagenzien

- Anreicherungsmedium

Basisnährboden

Trypticase Soya Broth (Oxoid CH 129) mit
0,6% Hefezusatz (BBL 11929)

supplementiert mit:

Acriflavin (Sigma, A 8251)	15 mg/l
Nalidixinsäure (Sigma, N 4382)	40 mg/l
Cycloheximid (Sigma, C 6255)	50 mg/l

- Nachweismedium (modifizierter McBride-Agar)

Basisnährboden

Phenylethanolagar (Difco 0504-05-6)
mit 1 % Glycin- (Sigma, G 7251) und
0,05 % Lithiumchloridzusatz (Sigma, L-0505)

supplementiert mit:

Cycloheximid (Sigma, C-6255)	200 mg/l
------------------------------	----------

- 0,5 % KOH-Lösung (Merck, 5033)

- Blutagar

Fleischextrakt (Merck, 3979)	0,5 %
Hefeextrakt (Merck, 3753)	0,3 %
NaCl	0,3 %
Na-Hydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, 6580)	0,2 %

Pepton aus Casein (Merck, 7213)	1,0 %
Agar-Agar (Merck, 1614)	2,0 %
Glucose-Monohydrat (Merck, 8346)	0,1 %
Rinderblut	10 %

- SIM-Medium

SIM-Nährboden (Oxoid CM 435) mit
0,6 % Hefezusatz (BBL 11929)

- Oxidase-Reagens

Patho-Tec-CO Streifen (Organon Teknika 621 901)

- 3 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung

- Kulturmedium (flüssig)

Trypticase Soya Broth (BBL 11768) mit
0,6 % Hefezusatz (BBL 11929)

- Zuckerlösungen

Basisnährboden

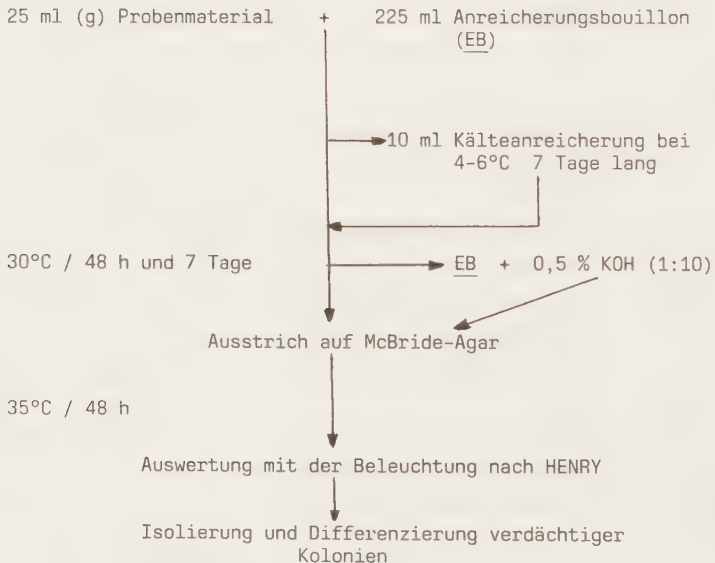
Purple Broth Base (Difco 0227-01-6)
zufügen des jeweiligen Kohlenhydrates:

Dextrose (Merck, 8346)	0,5 %
Äsculin (Merck, 848)	0,5 %
Maltose (Merck, 5940)	0,5 %
Dulzit (Sigma D 0256)	0,5 %
Xylose (Sigma X 1500)	0,5 %
Salizin (Sigma S 0625)	0,5 %
Rhamnose (Sigma R 3875)	0,5 %

3.3. Methodik des Listeriennachweises

Der Nachweis für L.m. im Untersuchungsmaterial wurde in Anlehnung an die Methode der Food and Drug Administration (FDA) durchgeführt. Abbildung 10 stellt die Nachweismethode nach einem Schema von TERPLAN et al. (1986) dar.

Abbildung 10: FDA - Nachweismethode für Listerien
(nach einem Schema von TERPLAN et al.,
1986)



3.3.1 Selektive Anreicherung

25 ml der Milchproben wurden mit einer sterilen Pipette 225 ml des Anreicherungsmediums (3.2) zugesetzt und gründlich durchgemischt. Von jeder solchen Suspension wurden 10 ml in ein steriles Kölbchen überführt und zur Kälteanreicherung bei 4-6°C im Kühlschrank 7 Tage lang gelagert. Die übrige Anreicherungssuspension wurde bei 30°C 7 Tage lang bebrütet; mit der kälteangereicherten Suspension wurde nach der Inkubation im Kühlschrank entsprechend verfahren.

Das festere Probenmaterial (Silage, Kot, Futterrübe) wurde zuerst mit dem Ultraturrax homogenisiert und dann der Anreicherungslösung zugegeben.

Im weiteren Verlauf wurde mit beiden Anreicherungssuspensionen gleich verfahren:

Nach 48 h bzw. nach 7 Tagen wurde je ein ml der Anreicherungslösung in 9 ml 0,5% KOH-Lösung (3.2) übertragen, gemischt und unmittelbar darauf mit einer Öse (0,01 ml) auf McBride-Agar (3.2) ausgestrichen. Die KOH schädigt die Begleitflora stärker als die Listerien, womit eine weitere Selektivität erzielt wird.

Die Platten wurden nach 48 h Bebrütung bei 35°C mit der Beleuchtungstechnik nach HENRY (1933) ausgewertet. Hierzu wurde Licht über einen Spiegel in einem 45° Winkel von unten auf die Platte geleitet. Bei senkrechter Beobachtung der Platte von oben erscheinen die 1 - 1,5 mm großen Listeria-Kolonien dann blau-

grau.

Um eine Einübung für eine Identifikation der *Listeria*-Kolonien zu gewährleisten, sowie die Qualität der Nährböden zu kontrollieren, wurde mit jeweils jeder Probencharge eine positive Kontrolle eines L.m.-Referenzstammes in Reinkultur angereichert und ausgestrichen. Eine Probencharge umfaßte durchschnittlich 28 Proben.

3.3.2 Bestätigung der verdächtigen Isolate

Zu diesem Zweck wurden folgende Tests durchgeführt:

a) Hämolyse-Aktivität

Verdächtige Kolonien wurden auf eine Blutagar-Platte (3.2) überimpft und 24 h bei 37°C bebrütet. L.m.-positive Kulturen zeigen eine schmale Hämolysezone.

b) Nativpräparat

Verdächtige Kolonien auf der Blutagar-Platte wurden in das flüssige Kulturmedium (3.2) überimpft und 24 h bei 35°C bebrütet. Von der Kultur wurde dann ein Nativpräparat hergestellt und unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Die *Listerien* erscheinen als kurze, kokkoide Stäbchen mit runden Enden, auch Ketten- und V-Formen kamen vor. Es zeigte sich die charakteristische taumelnde Bewegung der Keime.

c) Gram-Färbung

Die Ausstrichpräparate wurden nach Gram gefärbt. Listerien sind grampositiv.

d) Katalase-Test

Die Katalase-Aktivität wurde mit 3 %iger H_2O_2 -Lösung geprüft. Dazu wurde auf einem Objektträger die zu untersuchende Kolonie in einem Tropfen des Reagenzes (3.2) verrieben. Bei Vorliegen einer Listeria-Kolonie wurde sofort Sauerstoff freigesetzt.

e) Cytochromoxidase-Aktivität

Die Prüfung erfolgte mit Reagenz-Streifen (3.2) Listerien erbringen keine Farbreaktion, sie sind Oxidase-negativ.

f) Beweglichkeit

Die Beweglichkeit wurde mit dem SIM-Medium (3.2) getestet. Die verdächtige Kolonie wurde mit einer Öse in das Medium eingestochen und 48 h bei 30°C bebrütet. Im positiven Fall wurde um den Stichkanal eine diffuse Trübung festgestellt mit typischem "Umbrella"-Phänomen.

g) Kohlenhydratspaltung

Zuletzt wurde die Differenzierung bei positiven Kulturen anhand der Kohlenhydratspaltung vorgenommen. Dazu wurden die Kolonien in Röhrchen mit

flüssigem Kulturmedium (3.2) mit der Öse überimpft und 24 h bei 30°C inkubiert. Davon wurden je 0,3 ml zu den Fermentationstest-Medien gegeben und bei 37°C bis zu einer Woche lang bebrütet. L.m. bildet Säure ohne Gas aus Dextrose, Maltose, Äsculin, Rhamnose und Salizin und zeigt keine Reaktion bei Xylose und Dulzit.

Die serologische Typendifferenzierung der isolierten L.m.-Stämme wurde im Referenzlabor für Listerien am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg (Prof. Dr. H.P.R. Seeliger) durchgeführt.

3.4 Ergebnisse

Die Untersuchung der 635 Bestandsmilchproben erbrachte in zwei Proben aus zwei Beständen die L.m.-Isolierung. Diese positiven Befunde wurden aus Proben vom Februar und März 1987 erhoben. Bei den Umgebungsuntersuchungen in diesen Betrieben konnten mögliche Kontaminationsquellen erfaßt werden. Dieselben L.m.-Serotypen wie in den Milchproben dieser Betriebe waren auch in Futtermitteln zu finden. Sonstige Listerien-Spezies waren in den untersuchten Proben nicht zu finden .

Im einzelnen stellte sich die Situation wie folgt dar:

Betrieb A (Bestandsmilch: Serotyp 1/2a) hatte 10 klinisch gesunde Kühe in Laktation, die mit Silage gefüttert wurden. Eine Listeriose-Erkrankung war im Betrieb nie aufgetreten. Bei der Besichtigung der Silomasse in einem alten Hochsilo wurde festgestellt, daß ein Teil der Silage verdorben und verschimmelt war. Mehrere faustgroße Klumpen solchen Silage wurden auch im Futtertrog vor den Tieren gefunden. Die Silage reichte noch für etwa 14 Tage nach Versuchsbeginn aus, danach fütterte man, neben Kraftfutter, nur noch Heu und Futterrüben.

Von der Silage wurden vier Proben genommen, zwei davon aus schimmeligen Klumpen. Von allen Kühen wurden Milch- und Kotproben entnommen.

Aus einer Silageprobe mit pH-Wert 7,1 konnte L.m. isoliert werden (Serotyp 1/2a), alle anderen Proben waren negativ.

Eine wiederholte Probenentnahme und Untersuchung nach vier Wochen, mit gleicher Probenzahl, außer Silage, die nicht mehr vorhanden war, verlief negativ.

Im Betrieb B (Bestandsmilch: Serotyp 4b) befanden sich zwei Kühe im Stall, von denen eine trocken stand. Der kleine Stall, in dem die zwei Kühe hygienisch schlecht untergebracht waren, war schmutzig, feucht und schlecht entmistet. Auf dem Boden befanden sich verschimmelte Futterreste (Futterrüben). Gefüttert wurde Heu von schlechter Qualität (verregnet) und Futterrüben, die ebenfalls schlechte Qualität aufwiesen (hohl, verschimmelt und teilweise verfault). Es wurde keine Silage verabreicht. Die Kühe waren klinisch gesund.

Es wurden Viertelgemelksproben von der laktierenden Kuh, sowie Kot- und Futterproben (Heu, Futterrüben) entnommen. Aus einer Rübenprobe gelang die L.m.-Isolierung (Serotyp 4b), die andere Proben waren negativ. Wiederholungsuntersuchungen (außer Rüben, die inzwischen verbraucht waren) verliefen ebenfalls negativ.

In einem dritten Betrieb C , der von Anfang an als einziger Verdachtsbetrieb galt, befanden sich 15 Kühe im Stall. Im September 1986 hatten zwei Tiere im zweiten Trächtigkeitsdrittel (5. bzw. 6. Monat) verkalbt. Beide Kühe bekamen danach hohes Fieber. Auf Veranlassung eines Tierarztes wurde eins von beiden abortierten Kälber in unserem Institut untersucht. Aus Organproben (Leber und Niere) konnte L.m. isoliert werden.

Bei der Bestandsbesichtigung im November 1986 wurden die Viertelgemelksproben aller Kühe (120 Proben) untersucht. In keiner Probe konnten Listerien nach-

gewiesen werden. Auch eine wiederholte Untersuchung neu entnommener Proben nach vier Wochen blieb ergebnislos. Alle Tiere im Bestand waren klinisch gesund und wurden nur mit Grünfutter und Heu gefüttert.

Aus den 68 Viertelgemelken und 184 Mischproben aus vier Viertelgemelken von insgesamt 201 Kühen aus den vier Vorzugsmilchbetrieben (September 1986 bis Dezember 1986) konnten in keiner Probe Listerien isoliert werden.

Ebenfalls negativ verlief die Untersuchung der 32 Zentrifugenschlammproben der 12 Käsereien (entnommen von September 1986 bis Januar 1987).

In den Beständen, aus denen die Anlieferungsmilch für die Käsereien stammte, darf an die Kühe keine Silage verfüttert werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11 : L.m.-Vorkommen im untersuchten Material

Probenart	Anzahl	L.m.-Isolate	Serotyp
Bestandsmilch	635	2	1/2a,4b
Mischproben aus vier Viertelgemelken (eine Probe/Kuh)			
Vorzugsmilchbetriebe	184	-	-
Viertelgemelksproben (vier Proben/Kuh)			
a) Vorzugsmilchbetriebe	68	-	-
b) Nachproben (Punkt 3. und 4. aus Tabelle 7)	208	-	-
Silage	4	1	1/2a
Futterrübe	1	1	4b
Kot	22	-	-
Heu	2	-	-
Zentrifugenschlamm	32	-	-
Gesamt:	1156	4	2 x 1/2a 2 x 4b

4. DISKUSSION

In der Zeit von Juni 1986 bis Mai 1987 wurden 635 Bestands-Rohmilchproben aus Sammel tanks aus einem Umkreis von ca 120 km, auf das Vorkommen von L.m. kulturell untersucht. Die Keimisolierung gelang in zwei Proben (0,31 %). Anschließende Nachuntersuchungen in den betreffenden Betrieben ergaben jeweils ein L.m.-Isolat aus verdorbener Silage bzw. einer verschimmelten Futterrübe. Es gelang jedoch nicht aus den Milch- und Kotproben von den Kühen in diesen Beständen Listerien zu isolieren. In diesen Betrieben gab es keine klinischen Hinweise auf Listeriose-Erkrankungen und es traten keine Aborte ungeklärter Genese zur Zeit der Untersuchung auf.

Bei dem auf Grund früherer Listeriose-Aborte als "Verdachtsbetrieb" geführten Bestand konnten Listerien aus der Milch der einzelnen Kühe ebenfalls nicht isoliert werden.

In der gleichen Zeit wurden Rohmilchproben (68 Viertelgemelksproben und 184 Mischproben aus vier Viertelgemelken) von 201 Kühen aus vier Vorzugsmilchbetrieben untersucht. Die Proben wurden direkt aus dem Euter der einzelnen Tiere entnommen, die Untersuchung auf das Vorkommen von L.m. verlief negativ.

Die ebenfalls versuchte Anzüchtung von L.m. aus 32 Zentrifugenschlammproben aus 12 Käsereien gelang nicht.

Insgesamt konnte somit nur eine sehr geringe Kontamination der Milch mit Listerien festgestellt werden. Im Vergleich zu den wenigen Literaturstellen, in denen Übersichtsuntersuchungen aus unverdächtigen Beständen auf Listerien beschrieben wurden und Ergebnisse zwischen 4,2 % (GLEDEL, 1986; LOVETT et al., 1987) und 45,3 % (DOMINGUEZ et al., 1985) bzw. 12,4 % (HAYES et al., 1986) positiven L.m.-Isolate erzielt wurden, wird bei dieser Untersuchung die geringste Häufigkeit des Vorkommens von L.m. in Rohmilch festgestellt. Besondere Aussagekraft ist durch das negative Ergebnis des Zentrifugenschlammes gegeben, zumal in diesem Untersuchungsmaterial das Sediment der Milch aus zahlreichen Anlieferbetrieben vorliegt. Daher sollte allerdings nicht vergessen werden, daß zahlreiche Bakterien von den Fettkügelchen beim Zentrifugiervorgang mitgerissen werden.

Bei der Bewertung der Ergebnisse ist allerdings auch auf die von LOVETT et al. (1987) beschriebene Empfindlichkeit der Methode hinzuweisen. Obwohl diese Autoren die besten Isolierungsergebnisse bei Rohmilch nach 24 h Anreicherungszeit erzielten, empfehlen sie auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 7 Tage, was möglicherweise eine bessere Wiederauffindung von geschädigten Listerien aus Milch und Milchprodukten ermöglicht. Es kann weniger als ein Keim pro ml Milch erfaßt werden. Die eingesetzte Untersuchungsmethode gilt als die derzeit nicht nur praktikabelste, sondern auch empfindlichste. Methodische Unterschiede dürfen somit als Grund für differierende Ergebnisse anderer Untersuchungen mit höherer Listerienausbeute ausscheiden.

Zu erörtern bleibt somit lediglich der möglicherweise große regionale Unterschied:

1. im klinisch erkennbaren und latenten Listeriose-Befallsgrad der untersuchten Rinderpopulation,
2. in der Listerienhäufigkeit im Futter, der Stallhygiene, der Hygiene der Milchgewinnung und Milchverarbeitung.

Deutliche regionale Unterschiede bei allgemein niedrigem Keimniveau in Sammelmilch fielen auch schon LOVETT et al. (1987) auf.

Zu 1. :

- a) Die Statistik der Abteilung für Pathologische Anatomie des Untersuchungsamtes Aulendorf (Jahresbericht 1987) weist 56 Listeriose-Fälle bei Rindern aus (histologische Stammhirnpräparate). Enthalten sind dabei auch Nichtmilchkühe, sowie Schlachtrinder, die zur Schlachtung aus anderen Regionen (Bayern) in den Regierungsbezirk Tübingen gelangt sind. Die Diagnose-Häufigkeit ist seit Jahren etwa in dieser Größenordnung. Es werden zwar sicher nicht alle Fälle erfaßt. Da bei nachgewiesener Listeriose-Erkrankung beim Rind finanzielle Beihilfe gewährt wird, besteht aber eine hohe Tendenz zur Verdachtsmeldung.

1986 wurden im Regierungsbezirk Tübingen 649.604 Rindern gehalten (Viehzählung 1986). Verglichen an diesem Tierstapel ist die o.a. Erkrankungshäufigkeit als äußerst gering zu beurteilen. Allein

deswegen sind auf Grund von Listeriose-Erkrankungen positive Befunde in der Milch kaum zu erwarten.

Die Erkrankungshäufigkeit in den Gegenden, aus denen das Untersuchungsmaterial anderer Untersucher stammte, ist nicht bekannt. Differenzen der Ergebnisse könnten in einer dort allgemein größeren Listeriose-Häufigkeit begründet sein.

- b) Über die Häufigkeit von durch Listerien verursachten Mastitiden liegen außer wenigen Einzelfall-Mitteilungen (s. Kap. 2.4.1) keine Angaben vor. Auch am Untersuchungsamt Aulendorf werden Milchproben von Mastitis-Kühen, die zur Erregerdiagnostik eingesandt werden, nicht routinemäßig auf Listerien untersucht. Dies wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Im allgemeinen wird auch für Listerien die für Bakterien bekannt schwer durchlässige Blut-Euter-Schranke gelten. Die experimentellen Untersuchungen von DEDIÉ (1955 und 1958) an verschiedenen künstlich infizierten Tieren scheinen dies zu bestätigen.

Die Hauptkrankheitsformen beim Rind sind zerebraler bzw. metritischer Art (AMTSBERG, 1980; DIJKSTRA, 1987). Somit wird auch hieraus verständlich, warum Listerien-Mastitiden selten beobachtet werden.

Ob durch den Erreger aufsteigende Mastitiden verursacht werden, wird eine Frage des Infektionsdruckes und damit der Futterqualität und Stallhygiene sein. DEDIÉ (1955) beschreibt, daß ihm mit einer Keimsuspension eine galaktogene Infektion des Euters gelungen ist. Hierzu wird unter Punkt 2 noch näher eingegangen.

- c) Traditionell ist das Einzugsgebiet eine ausgesprochene Milcherzeugungsregion. Entsprechend ist im Bewußtsein der Landwirte verankert, Milch von mastitiskranken Kühen nicht den Molkereien anzuliefern. Diesbezügliche Kontrollen sowie das Bezahlungssystem tragen hierzu bei. Somit ist auch deswegen die Wahrscheinlichkeit herabgesetzt, daß die Milch einer eventuell an Listeriose-Mastitis erkrankten Kuh in den Verkehr kommt.

Zu 2. :

Wie bei den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen, so wiesen auch andere Autoren darauf hin, daß die Listerienkontamination der Milch durch Keime aus der Umgebung erfolgen kann (SCHULZ, 1967; AMTSBERG et al., 1969; AMTSBERG, 1980). In dieser Arbeit wird ein Zusammenhang zwischen Erreger im Futter und in der Milch durch die negativen Ergebnisse der Viertelgemelksproben und die Typidentität des Erregers aus den Futtermitteln mit denen in der Milch hergestellt. Die ungenügenden Hygienebedingungen in den beiden Betrieben, aus denen die positive Proben stammen, unterstützen die Annahme, daß die Listerien in der Milch aus dem Futter stammen. Die Betriebe, in denen das Untersuchungsmaterial dieser Arbeit entnommen wurde, wurden im einzelnen auf ihren Hygiene-Status bzw. auf die Futterqualität - insbesondere der Silage - nicht erfaßt. Zustände wie in den beiden vorher erwähnten Beständen sind jedoch als Ausnahme zu betrachten.

Auch DOMINGUEZ et al. (1985) weisen darauf hin, daß die Umgebungsbedingungen der Tierhaltung und Milchge-

winnung eine erhebliche Rolle für die Kontaminationshäufigkeit der Milch mit Listerien spielt. Ihr Untersuchungsmaterial stammte aus zahlreichen kleinen Betrieben mit zweifelhaften hygienischen Bedingungen; sie versuchen so ihre relativ hohe L.m.-Isolierungsrate (45,3 %) zu erklären. Allerdings werden die Resultate von Fachleuten mit Zurückhaltung gewertet.

Hinsichtlich der Verfütterung von Silage, die bei ungenügender Säuerung gute Wachstumsbedingungen für L.m. bietet, hätte man in den Wintermonaten vielleicht mehr positive Listeria-Isolate erwarten können. Daß dies nicht der Fall war, mag auch damit zusammenhängen, daß die Technik der Silageherstellung im hiesigen Gebiet von den Landwirten gut beherrscht wird und eine Tradition hat, was sich in der meist guten Qualität der Silage bemerkbar macht. Andererseits liegen viele Betriebe, aus denen die Proben stammten, im sogenannten "Ementaler-Gebiet", wo wegen der Milchanlieferung an die entsprechenden Käsereien keine Silage gefüttert werden darf. Fast 50 % der untersuchten Proben stammten aus solchen Beständen.

Die gefundenen L.m.-Serotypen 1/2a und 4b kommen bei menschlichen und tierischen Infektionen am häufigsten vor (SEELIGER, 1961; GRAY und KILLINGER, 1966; AMTSBERG, 1980). Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, daß aus der serologischen Zuordnung eines L.m.-Stammes nicht auf seine Pathogenität geschlossen werden kann, bzw. daß die serologische Zuordnung und Pathogenität bei Listerien nicht sicher korrelieren (RO-COURT, 1986).

Zusammenfassend ist somit festzuhalten:

1. Der Kontaminationsgrad der Milch ist in der untersuchten Region sehr gering.
2. Listerienhaltige Milch ist weniger ein Problem der Tiergesundheit als vielmehr der Futterqualität sowie der Stall- und Melkhygiene.

Die gefundenen Sekundärkontaminationen hätten vermutlich vermieden werden können:

- a) durch Beseitigung der verdorbenen Silage
- b) durch häufigere Reinigung des Futterganges
- c) durch Ausschneiden und Entfernen fauler Stellen an den Futterrüben
- d) durch Beachtung melkhygienischer Grundsätze.

5. ZUSAMMENFASSUNG

635 Bestandsmilchproben wurden kulturell auf Anwesenheit von Listerien geprüft. In 352 Betrieben wurde im Winter Silage gefüttert.

Die Isolierung von L.m. gelang in nur zwei Bestandsmilchproben (0,31 %). Nach den Ergebnissen gezielter Nachuntersuchungen in den beiden Beständen ist anzunehmen, daß die Keime aus verdorbener Silage bzw. aus verschimmelten Futterrüben stammten.

Aus Viertelgemelksproben konnten Listerien in diesen Betrieben nicht isoliert werden.

Die Untersuchungen von Viertelgemelksproben bzw. Mischproben aus vier Viertelgemelken von 201 Kühen aus vier Vorzugsmilchbetrieben verlief negativ.

Die Untersuchung von 32 Zentrifugenschlammproben aus 12 Käsereien erbrachte ebenfalls keinen positiven Listerienbefund.

6. SUMMARY

Incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk samples from the region Südwürttemberg

Six hundred and thirty five (635) farm milk samples were cultured for *Listeria*. Silage was fed on 352 farms.

Listeria monocytogenes was isolated from only two farm milk samples (0,31%). From the results of special follow-up examinations on those two farms it is assumed that the bacteria were originated from spoilt silage or mouldy fodder beet.

Quarter-milk samples did not yield *Listeria* on those farms.

The examination of quarter-milk samples or mixed samples from all four quarters on specially controlled dairy farms was negative for *Listeria*.

The examination of 32 centrifuge sediment samples from 12 cheese factories was also negative for *Listeria*.

7. LITERATURVERZEICHNIS

AA, R. VON DER (1963):

Zur Listeriose bei Tier und Mensch

Mh. Vet. Med. 18, 133-137

AMTSBERG, G. (1980):

Listerien

in: BLOBEL, H. und T.SCHLIESSER : Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band 2, 345-438

G. Fischer Verlag, Stuttgart und New York

AMTSBERG, G., A.ELSNER, H.A.GABBAR und W.WINKENWERDER (1969):

Die epidemiologische und lebensmittelhygienische Bedeutung der Listerieninfektion des Rindes

Dtsch. tierärztl. Wschr. 76, 497-501

ANNAGIEV, A.A. und J.G.AKHMEDOV (1970):

Tenazität der Listerien in Wasser und dessen Entkeimung (Russ.)

Veterinarija (Moskva) 47, 25-28

zit.n. AMTSBERG, G. (1980):

Listerien

in: BLOBEL, H. und T.SCHLIESSER : Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band 2, 345-438

G. Fischer Verlag, Stuttgart und New York

BEARNS, R.E. und K.F.GIRARD (1958):

The effect of pasteurisation on *Listeria monocytogenes*

Can. J. Microbiol. 4, 55-61

BECKERS, H.J., P.S.S.SOENTORO und E.H.M.DELFGOU-VAN ASCH (1987):

The occurence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat
Int. J. Food Microbiol. 4, 249-256

BEER, J., W.SEFFNER und J.POTEL (1957):

Listerienfunde bei Tieren und ihre Bedeutung für die Epidemiologie der Listeriose
Arch. Exp. Vet. Med. 11, 550-577

BEERENS, H. und M.M.TAHON-CASTEL (1966):

Milieu à l'acide nalidixique pour l'isolement des streptocoques, *D.pneumoniae*, *Listeria*, *Erysipelothrix*
Annales de l'Institut Pasteur, Paris 111, 90-93
zit.n. MAVROTHALASSITIS, P. (1977): A method for the rapid isolation of *Listeria monocytogenes* from infected material
J. Appl. Bact. 43, 47-52

BIESTER, H.E. und L.H.SCHWARTE (1939):

Studies on *Listerella* infection in sheep
J. Infect. Dis. 64, 135-164

BILLE, J. (1988):

Zur Listeriose-Situation in der Schweiz
Bulletin des Bundesamtes für Gesundheitswesen 3, 28

BOCKEMÜHL, J., H.P.R.SEELIGER und R.KATHKE (1971):

Acridinfarbstoffe in Selektivnährböden zur Isolierung von *Listeria monocytogenes*
Med. Microbiol. Immunol. 157, 84-95

BOCKEMÜHL, J., E.FEINDT, K.HÖHNE und H.P.R.SEELIGER
(1974):

Acridinfarbstoffe in Selektivnährböden zur Isolierung
von *Listeria monocytogenes*. II. Modifiziertes Stuart-
Medium: ein neues *Listeria*-Transport-Anreicherungs-
medium

Med. Microbiol. Immunol. 159, 289-299

BØJSEN-MØLLER, J. (1963):

Studies of the growth and isolation of *Listeria mono-*
cytogenes at low temperatures

Proc. 2nd Symp. on Listeric Infection, Bozeman, 169-172

Derselbe (1972):

Human Listeriosis. Diagnostic, epidemiological and
clinical studies

Acta Path. Microbiol. Scand. Sec. B 229, 1-155

BRADSHAW, J.G., J.T.PEELER, J.J.CORWIN, J.M.HUNT,
J.T.TIERNEY, E.P.LARKIN und R.M.TWEDT (1985):

Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk
J.Food Prot. 48, 743-745

BRADSHAW, J.G., J.T.PEELER, J.J.CORWIN, J.M.HUNT und
R.M.TWEDT (1987):

Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy
products

J. Food Prot. 50, 543-544

BUNNING, V.K., R.G.CRAWFORD, J.G.BRADSHAW, J.T.PEELER,
J.T.TIERNEY und R.M.TWEDT (1986):

Thermal resistance of intracellular *Listeria monocy-*
togenes cells suspended in raw bovine milk

Appl. Envir. Microbiol. 52, 1398-1402

BUNNING, V.K., C.W.DONNELLY, J.T.PEELER, E.H.BRIGGS,
J.G.BRADSHAW, R.G.CRAWFORD, C.M.BELIVEAU und J.T.TIERNEY
(1988):

Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within
bovine milk phagocytes

Appl. Environ. Microbiol. 54, 364-370

CONNER, D.E., R.E.BRACKETT und L.R.BEUCHAT (1986):

Effect of temperature, sodium chloride, and pH on
growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice

Appl. Environ. Microbiol. 52, 59-63

DE VRIES, J. und R.STRIKWERDA (1956):

Ein Fall klinischer Euterlisteriose beim Rind

Zbl. Bakt. Abt. I, Orig 167, 229

DEDIÉ, K. (1955):

Beitrag zur Epizootiologie der Listeriose

Arch. Exp. Vet. Med. 9, 251-264

Derselbe (1958):

Weitere experimentelle und Untersuchungsbefunde zur
Listeriose bei Tieren

Zbl. Vet. Med. , Beiheft 1, 99-106

DEDIÉ, K. und D.SCHULZE (1957):

Die Hitzeresistenz von *Listeria monocytogenes*

Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 70, 231-232

DGHM, Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikro-
biologie (1982):

Isolierung und Identifizierung von *Corynebacterium*,
Listeria und *Erysipelothrix*

Zbl. Bakt. Abt. I, Orig .A, 253, 43-60

DIJKSTRA, R.G. (1962):

Meningo-encephalitis listeriosa bij het rund

Tijdschr. Diergeneesk. 87, 1647

Derselbe (1965):

Studie über Listeriose bei Rindern

Diss. vet. med., Utrecht

Derselbe (1970):

Onderzoekingen omtrent de overlevingsduur van Listeria-bacterien in hersenweefsel-, silage- en faeces-suspensies en in melk bij $\pm$ 5°C

Tijdschr. Diergeneesk. 95, 1177-1180

Derselbe (1975):

Recent experiences on the survival times of Listeria bacteria in suspensions of brain tissue, silage, faeces and in milk

Proc. 6th Int. Symp. on Listeriosis, 71-74

Derselbe (1976):

Listeria encephalitis in cow trough litter from a broiler farm

Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. B, 161, 383-385

Derselbe (1987):

Listeriosis in animal. Clinical signs, diagnosis and treatment

in: SCHÖNBERG, A.: Listeriosis. Joint WHO/ROI consultation on prevention and control, Berlin (West)

VetMed-Hefte 5, 68-75

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, L., J.F.FERNANDEZ-GARAYZABAL,
J.A.VAQUEZ-BOLAND, E.RODRIGUEZ-FERRI und G.SUAREZ-
FERNANDEZ (1985):

Isolation de micro-organismes de *Listeria* à partir
de lait cru destiné à la consommation humaine
Can.J.Microbiol. 31, 938-941

DONKER-VOET, J. (1962):

Epidemiologie van listeriosis
Tijdschr. Diergeneesk. 87, 1657-1663

Dieselbe (1963a):

My view on the epidemiology of *Listeria* infections
Proc. 2nd Int. Symp. on Listeriosis, 133-139

Dieselbe (1963b):

Listeria infections in animals in the Netherlands
Proc. 2nd Int. Symp. on Listeriosis, 30-35

DONNELLY, C.W., E.H.BRIGGS und G.J.BAIGENT (1986):

Analysis of raw milk for the epidemic serotype of
L.monocytogenes linked to an outbreak of Listeriosis
in California
Dairy Food San. 6, 212

DONNELLY, C.W., E.H.BRIGGS und L.S.DONNELLY (1987):

Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes*
in milk as determined by two methods
J. Food Prot. 50, 14-17 u. 20

DOYLE, M.P. und J.L.SCHOENI (1986):

Selective enrichment procedure for isolation of *Liste-*
ria monocytogenes from faecal and biologic specimens
Appl. Environ. Microbiol. 51, 1127-1129

DOYLE, M.P., K.A.GLASS, J.T.BEERY, G.A.GARCIA, D.J.POLLARD
und R.D.SCHULTZ (1987):

Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during
high-temperature, short-time pasteurisation
Appl. Environ. Microbiol. 53, 1433-1438

EMMERLING, P., G.SCHRÖTER und H.HOF (1986):

Listeriose. Klinik, Epidemiologie, Pathogenese, In-
fektabwehr und Chemotherapie
in: Infektion und Infektabwehr
Schattauer Verlag, Stuttgart und New York

ERREBO-LARSEN, H. (1969):

Listeria monocytogenes. Studies on isolation techniques
and epidemiology
Diss. vet. med., Kopenhagen

ERREBO-LARSEN, H. und J.JENSEN (1977):

Occurance of bovine mastitis caused by *Listeria mono-*
cytogenes
Proc. 7th Int. Symp. on Listeriosis, Varna

FARBER, J.M. und J.I.SPEIRS (1986):

An ELISA method for the detection of *Listeria mono-*
cytogenes in raw milk
Dairy Food San. 5, 212

FERNANDEZ, J.F., L.DOMINGUEZ, J.A.VASQUEZ, M.P.ECHALECU,
J.A.GARCIA und G.SUAREZ (1985):

Listeria monocytogenes in raw and pasteurized milk
Proc. 9th Int. Symp. on Listeriosis, Nantes

FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F., L.DOMINGUEZ-RODRIGUEZ,
J.A.VASQUEZ-BOLAND, J.L.BLANCO-CANCELO und G.SUAREZ-
FERNANDEZ (1986):

Listeria monocytogenes dans le lait pasteurisé
Can. J. Microbiol. 32, 150-159

FLEMING, D.W., S.L.COCHI, K.L.McDONALD, J.BRONDUM,
P.S.HAYES, B.D.PLYKAITIS, M.B.HOLMES, A.AUDURIER,
C.V.BROME und A.L.REINGOLD (1985):

Pasteurized milk as a vehicle of infection in an out-
break of listeriosis

N. Engl. J. Med. 312, 404-407

GITTER, M. (1985):

A changing pattern of ovine listeriosis in Great Britain
Proc. 9th Int. Symp. on Listeriosis, Nantes

GITTER, M., R.BRADLEY und P.H.BLAMPIED (1980):

Listeria monocytogenes infection in bovine mastitis

Vet. Rec. 107, 390-393

GLEDEL, J. (1986):

Epidemiology and significance of listeriosis in France
in: SCHÖNBERG, A.: Joint WHO/ROI consultation on pre-
vention and control, Berlin (West)

VetMed-Heft 5, 9-20

GROTTKER, S. (1985):

Liquor-Untersuchungen bei der listerienbedingten Me-
ningoenzephalitis des Rindes

Dtsch.Tierärztl.Wschr. 92, 257-259

GRAY, M.L. (1960):

A possible link in the relationship between silage
feedings and listeriosis

J. Am.Vet. Med. Assoc. 136, 205-208

Derselbe (1962):

Listeria monocytogenes and listeric infection in the
diagnostic laboratory

Ann. N. Y. Acad. Sci. 98, 686-699

GRAY, M.L. und H.KILLINGER (1966):

Listeria monocytogenes and listeric infections
Bact. Rev. 30, 309-382

GRAY, M.L., H.J.STAFSETH, F.THORP, L.B.SCHOOL und
W.F.RILEY (1948):

A new technique for isolating *Listerellae* from the
bovine brain

J. Bacteriol. 55, 471-476

GRØNSTØL, H. (1979):

Listeria monocytogenes from grass silage

Acta Vet. Scand. 20, 492

Derselbe (1980):

Listeriosis in sheep

Acta Vet. Scand. 21, 1-10

HADZIMURATOVIC, M., A.DZUVIC, A.NEVJESTIC und V.IVETIC
(1983):

Listeria uzrokovana primjenom silaze u ishrani ovaca
Vet. Glasnik 37, 837-843

HAYES, P.S., J.C.FEELEY, L.M.GRAVES, G.W.AJELLO und
D.W.FLEMING (1986):

Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk

Appl. Environ. Microbiol. 51, 438-440

HENRY, B.S. (1933):

Dissociation in the genus *Brucella*

J. Infect. Dis. 52, 374-402

HIRSCHL, A., M.ROTTER, W.KOLLER und G.STANEK (1980):

Gehäuftes Auftreten von Neugeborenenlisteriose in
Wien

Wien. Klin. Wschr. 92, 44-47

HOFER, E. (1984):

Bacteriologic and epidemiologic studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in healthy cattle

Zbl. Bakt. Abt. I Orig. A, 256, 175-183

HYSLOP, N.S.G. (1975):

Epidemiologic and immunologic factors in listeriosis

Proc. 6th Int. Symp. on Listeriosis, 94-105

IVANOV, I. (1962):

Untersuchungen über die Listeriose in Bulgarien

Mh. Vet. Med. 17, 729-736

JAMES, S.M., S.L.FANNIN, B.A.AGEE, B.HALL, E.PARKER, J.VOGT, G.RUN, J.WILLIAMS, L.LIEB, C.SALMINEN, T.PRENDERGAST, S.B.WERNER und J.CHIN (1985):

Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese

Morbid. Mortal. Weekly Rep. 34, 357-359

JENSEN, J. und H.ERREBO-LARSEN (1973):

Listeria monocytogenes som arstag til 3 tilfaelde af mastitis hos kraeg

Nord. Vet. Med. 25, 322-329

KAMPELMACHER, E.H. und L.M.VAN NOORLE JANSEN (1969):

Isolation of *Listeria monocytogenes* from faeces of clinically healthy humans and animals

Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 211, 353-359

Dieselben (1972a):

Über die Isolierung von *Listeria monocytogenes* bei klinisch gesunden Personen

Zbl. Bakt. Abt. I Orig. A 221, 70-77

Dieselben (1972b):

Isolierung von *L.monocytogenes* mittels Nalidixin-säuretrypaflavin

Zbl. Bakt. I Orig. A 221, 139-140

Dieselben (1980):

Listeriose bei Menschen und Tieren in den Niederlanden 1958-1977

Zbl. Bakt. Abt.I Orig A 246, 211-227

KAMPELMACHER, E.H., W.T.HUYSINGA und L.M.VAN NOORLE JANSEN (1972):

The presence of *Listeria monocytogenes* in faeces of pregnant women and neonates

Zbl. Bakt. Abt. I Orig. A 222, 258-262

KAMPELMACHER, D.H., D.E.MAAS und L.M.VAN NOORLE JANSEN (1976):

Occurence of *Listeria monocytogenes* in faeces of pregnant women with and without direct animal contact

Zbl. Bakt. Abt. I Orig A 234, 238-242

KHAN, M.A., A.SEAMAN und M.WOODBINE (1977):

Immunofluorescent identification of *Listeria monocytogenes*

Zbl. Bakt. Abt. I Orig. A 239, 62-69

KOVINCIC, I., B.STAJNER, S.ZAKULA und M.GALIC (1979):

The finding of *Listeria monocytogenes* in the milk of cows from the infected herds

Proc. 7th Int. Symp. on Listeriosis, Varna

LARSEN, H.E. (1969):

Listeria monocytogenes. Studies on isolation technique and epidemiology

C.F.Mortensen Verlag, Kopenhagen

zit.n. AMTSBERG, G. (1980):

Listerien

in: BLOBEL, H. und T.SCHLIESSER: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band 2, 345-438

G.Fischer Verlag, Stuttgart und New York

LEHNERT, C. (1960):

Die Tenazität von *Listeria monocytogenes* in der Außenwelt

Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 180, 350-356

Derselbe (1964):

Bakteriologische, serologische und tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese, Epizootologie und Prophylaxe der Listeriose

Arch. Exp. Vet. Med. 18, 981-1027 und 1247-1302

LIEBE, S. (1973):

Aus der Humanmedizin: Die Listeriose

Tierärztl. Praxis 1, 489-497

LØKEN, T., E.ASPØY und H.GRØNSTØL (1982):

Listeria monocytogenes excretion and humoral immunity in goats in a herd with outbreaks of listeriosis and in a healthy herd

Acta Vet. Scand. 23, 392-399

LOVETT, J., D.W.FRANCIS und J.M.HUNT (1985):

A method for isolating *Listeria monocytogenes* from milk

Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. 253, 17

Dieselben (1987):

Listeria monocytogenes in raw milk: detection, incidence and pathogenicity

J. Food Prot. 50, 188-192

MAUPAS, P.H., J.C.BIND, J.P.CHIRON und J.P.DARCHIS (1975):

Epidemiologic and pathogenic conception of animal and human listeriosis

Proc. 6th Int. Symp. on Listeriosis, 221-224

MILLER, J.K. und T.MURASCHI (1962):

Relation of *Listeria monocytogenes* in vaginal flora as detected by immunofluorescence and the interruption of pregnancy

Proc. 2nd Int. Symp. on Listeriosis, 325

MURRAY, E.G.D., R.A.WEBB und M.B.R.SWANN (1926):

A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.)

J. Path. Bact. 29, 407-439

NIELSEN, L. (1985):

Listeria-mastitis

Mastitis-Nyt, 2, 5-7

zit. n. SKOVGAARD, N. (1987):

Listeria: major sources and routes of human infection environment and plants

in: SCHÖNBERG, A.: Listeriosis. Joint WHO/ROI consultation on prevention and control, Berlin (West)

VetMed-Hefte 5, 110-121

NICOLAI-SCHOLTEN, M.E., J. PÖTEL, J. NATZSCHKA und
S. PEKKER (1985):

Vermehrtes Auftreten von Listeriose-Erkrankungen in
Niedersachsen, 1983

Immun. Infekt. 13, 76-77

OBIGER, G. und A. SCHÖNBERG (1973):

Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Nähr-
medien zur bakteriologischen Diagnose der Listeriose
Fleischwirtsch. 10, 1452-1456

ÖRTEL, S. (1975):

Listerienausscheider und ihre epidemiologische Bedeu-
tung

Münchn. Med. Wschr. 117, 1145-1148

PIRIE, J.H.H. (1927):

A new disease of velt rodents "Tiger River Disease"

S. African Inst. Med. Res. 3, 163-186

Derselbe (1940):

Listeria: change of name for a genus of bacteria

Nature (London) 145, 264

PÖTEL, J. (1953/54):

Ätiologie der Granulomatosis infantiseptica

Wiss. Z. Martin Luther Univ. Halle-Wittenb. 3, 341-364

Derselbe (1968):

Die Listeriose unter besonderer Berücksichtigung der
Epidemiologie

Fleischwirtsch. 48, 301-306

Derselbe (1983):

Zunehmend häufiger: Listeriose

Dtsch. Ärzteblatt 80, 39-40

RALOVICH, B. (1984):

Listeriosis research. Present situation and perspective

Academia Keado, Budapest

RALOVICH, B., A.FORRAY, E.MALOVICS und I.SZAZADOS

(1971):

New selective medium for isolation of *Listeria monocytogenes*

Zbl. Bakt. Abt. I Orig 216, 88-91

RHOADES, H.E. (1970):

Effects of 20 years storage on lyophilized cultures of bacteria, molds, viruses and yeasts

Am. J. Vet. Res. 31, 1867-1870

ROCOURT, J. (1986):

Identification of *Listeria* isolates

in: SCHÖNBERG, A.: Listeriosis. Joint WHO/ROI consultation on prevention and control, Berlin (West)

VetMed-Hefte 5, 134-142

ROCOURT, J. und P.A.D. GRIMONT (1983):

Listeria welshimeri sp.nov. and *Listeria seeligeri* sp.nov.

Int. J. System. Bacteriol. 23, 866-869

ROCOURT, J. und H.P.R.SEELIGER (1985):

Distribution des especes du genre *Listeria*

Zbl. Bakt. Abt. I Orig A 259, 317-330

ROCOURT, J., A.SCHRETENBRUNNER und H.P.R.SEELIGER
(1983a):

Differentiation biochemique des groupes genomiques
de *Listeria monocytogenes* (sensu lato)

Annls. Microbiol. 134 A, 65-71

ROCOURT, J., F.GRIMONT, P.A.D.GRIMONT und H.P.R.SEELIGER
(1983B):

DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes*
(sensu lato)

Curr. Microbiol. 7, 383-388

SCHLECH, W.F., P.M.LAVIGNE, R.A.BORTOLUSSI, A.C.ALLEN,
E.V.HALDANE, A.J.WORT, A.W.HIGHTOWER, S.E.JOHNSON,
S.H.KING, E.S.NICHOLLS und C.V.BROOME (1983):

Epidemic of Listeriosis - evidence for transmission
by food

N. Engl. J. Med. 308, 203-206

SCHULZ, G. (1967):

Untersuchungen über das Vorkommen von Listerien in
Rohmilch

Mh. Vet. Med. 22, 766-768

SEELIGER, H.P.R. (1958):

Listeriose

Barth Verlag, Leipzig

Derselbe (1961):

Listeriosis

S.Karger Verlag, Basel und New York

Derselbe (1971):

Die Beziehungen zwischen der Listeriose bei Mensch
und Tier

Annls. Med. Vet. 115, 73-86

Derselbe (1981):

Apathogene Listerien: *Listeria innocua* sp.n.

Zbl. Bakt. Abt. I Orig. A 249, 487-493

Derselbe (1982):

Listeriose - Meningoenzephalitis

Bundesgesundheitsblatt 25, 222-224

Derselbe (1987):

Listeriose-aktuell

Dtsch. Med. Wschr. 112, 359-361

SEELIGER, H.P.R. und G.LINZENMEIER (1953):

Die Listeriose und ihre Erreger (*Listeria monocytogenes*)

Zbl. Bakt. Abt. I Orig. A 136, 335-378

SEELIGER, H.P.R. und H.J.WELSHIMER (1974):

Genus *Listeria*

in: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,
8. Auflage, p. 593-596

Eds.: BUCHANAN, R.E. und N.E.GIBBONS,

Williams und Wilkins, Baltimore

SEELIGER, H.P.R. und D.JONES (1986):

Genus *Listeria* Pirie 1940

in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,
Vol.2, p. 1235-1245

Eds.: SNEATH, P.H.A., N.S.MAIR, N.E.SHARPE und J.C.HOLT

Williams und Wilkins, Baltimore

SEELIGER, H.P.R., P.EMMERLING und H.EMMERLING (1968):

Zur Verbreitung der Listeriose in Deutschland

Dtsch. Med. Wschr. 93, 2037-2043

SEELIGER, H.P.R., F.SANDER und J. BOCKEMÜHL (1970):
Zum kulturellen Nachweis von *Listeria monocytogenes*
Z. Med. Mikrobiol. Immunol. 155, 352-368

SEELIGER, H.P.R., A.SCHRETTENBRUNNER und J.ROCOURT
(1981):
Serological and biochemical studies on *L. monocytogenes*
serovar 5
Proc. 8th Int. Symp. on Listeriosis, Madrid , p. 25

SEELIGER, H.P.R., A.SCHRETTENBRUNNER, G.PONGRATZ und
H.HOF (1982):
Zur Sonderstellung stark hämolysierender Stämme der
Gattung *Listeria*
Zbl. Bakt. Abt. I Orig A 252, 176-190

SEELIGER, H.P.R., J.ROCOURT, A.SCHRETTENBRUNNER,
P.A.D.GRIMONT und D.JONES (1984):
Listeria ivanovii sp.n.
Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 336-337

SIELAFF, H. (1966):
Die lebensmittelhygienische Bedeutung der Listeriose
Mh. Vet. Med. 21, 750-758 und 792-796

SIPKA, M. (1961):
Listeria monocytogenes in der Milch einer Kuh
Mh. Vet. Med. 22, 766-768

SMITH, C.W., J.D.MARSHALL und W.C.EWELAND (1960):
Identification of *Listeria monocytogenes* by the
fluorescent antibody technic
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 103, 842-845

STAJNER, B. (1971):

Izlucivanje listerija mlekom inficiranih krava
Diss. vet. med. , Beograd

TERPLAN, G., R.SCHOEN, W.SPRINGMAYER, I.DEGLE und
H.BECKER (1986):

Listeria monocytogenes in Milch und Milchprodukten
Dtsch. MolK.-Ztg. 41, 1358-1368

VIZCAINO, L.L. und A.G.MIRANDA (1974):

A note on Listeria milk excretion in seropositive
apparently healthy cows
Proc. 6th Int. Symp. on Listeriosis, Nottingham

WEIS, J. (1973):

Beobachtungen über Listeriose bei unseren nutzbaren
Haustieren
Tierärztl. Umschau 28, 652-654

WEIS, J. und H.P.R.SELLIGER (1975):

Incidence of Listeria monocytogenes in nature
Appl. Microbiol. 30, 29-32

WELSHIMER, H.J. (1968):

Isolation of Listeria monocytogenes from vegetation
J. Bacteriol. 95, 300-303

WELSHIMER, H.J. und J.DONKER-VOET (1971):

Listeria monocytogenes in nature
Appl. Microbiol. 21, 516-519

WRAMBY, B.O. (1944):

Om Listerella monocytogenes bakteriologi och om fore-
komst av listerella infektioner hos djur
Skand. Vet. Tidskr. 34, 277-279

Abschließend danke ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit. Frau Dr. R. Schoen sei in diesem Sinne ebenfalls herzlich gedankt.

Herrn Ltd. Reg. Vet. Direktor Dr. B. Müller danke ich sehr für die großzügig gewährten Arbeitsbedingungen im Untersuchungsamt Aulendorf.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Herren RVR Dr. M. Sabolic und ORVR Dr. W. Unglaub vom Staatl. Tierärztl. Untersuchungsamt Aulendorf für wertvolle Hinweise und ihre Hilfsbereitschaft bei der Ausarbeitung des Themas.

Für die serologische Typendifferenzierung der isolierten *Listeria*-Stämme am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Seeliger herzlichst.

L e b e n s l a u f

Emil Gasparovic	geb. 21.03.1942 in Lokve (Jugoslawien)
Eltern	Vladislav Gasparovic Vjenceslava Gasparovic, geb.Turina
1949 - 1960	Besuch der Volksschule und des Gymnasiums in Zagreb
05.09.1960	Reifeprüfung
1962 - 1968	Studium der Tiermedizin an der Universität Zagreb mit Diplom- abschluß
1969 - 1976	Als prakt. Tierarzt in Jugosla- wien und in der Bundesrepublik Deutschland tätig, danach berufs- fremd tätig
08.07.1985	Approbation als Tierarzt in der Bundesrepublik Deutschland

